



**Le collagène XXII, composant de la jonction  
myotendineuse, est un nouveau gène candidat dans les  
dystrophies musculaires : étude fonctionnelle chez le  
poisson zèbre**

Benjamin Charvet

► **To cite this version:**

Benjamin Charvet. Le collagène XXII, composant de la jonction myotendineuse, est un nouveau gène candidat dans les dystrophies musculaires : étude fonctionnelle chez le poisson zèbre. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10055 . tel-00857349

**HAL Id: tel-00857349**

**<https://theses.hal.science/tel-00857349>**

Submitted on 3 Sep 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 5 avril 2011

par

CHARVET Benjamin

TITRE :

Le collagène XXII, composant de la jonction myotendineuse, est un nouveau gène candidat dans les dystrophies musculaires. Etude fonctionnelle chez le poisson zèbre.

Directeur de thèse : Florence RUGGIERO

JURY : Dr. Pierre Yves RESCAN

Dr. Pascal DE SANTA BARBARA

Dr. Estelle HIRSINGER

Pr. Katherin GIESELER

Pr. Manuel KOCH

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### Président de l'Université

**M. le Professeur L. Collet**

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Secrétaire Général

M. G. Gay

### *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

### *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS*

#### *DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard



À mes parents, mon frère et ma grand-mère.

En mémoire de mon grand-père, Guido.

*« Là où il y a collagène, y'a pas de plaisir, ... »*

Frédéric Beigbeder

*[Vacances dans le coma]*

## Remerciements :

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans un premier temps au laboratoire « Matrice extracellulaire et développement » dirigé par le Dr. Florence Ruggiero au sein de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, dirigé par le Pr. Gilbert Deléage, qui est ensuite devenu le laboratoire de « Biologie et pathologie des matrices extracellulaires » au sein de l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, dirigé par le Dr. Vincent Laudet.

Tout d'abord, je tiens à remercier Messieurs Pierre-Yves Rescan et Pascal de Santa Barbara, qui m'ont fait l'honneur d'être mes rapporteurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance. Je tiens également à remercier le Dr. Estelle Hirsinger et le Pr. Katherin Gieseler qui ont accepté de juger mon travail.

Je tiens ensuite à exprimer mon infinie gratitude à Manuel Koch, qui, en plus d'avoir la gentillesse de juger mon travail, a été un véritable mécène pour moi, en finançant ma deuxième année de thèse ce qui m'a permis de continuer ce projet qui me tient tant à cœur. Manuel Koch m'a également accueilli pendant 4 mois dans son laboratoire de Cologne. Cette expérience a été un événement majeur dans mon épanouissement aussi bien professionnel que personnel.

Je remercie également Bruno Allard, pour m'avoir aidé à réaliser l'étude sur les mesures de contractions musculaires. Je n'aurais jamais pensé réussir de si petits montages avec mes gros doigts. Grâce à lui les termes « transducteur mécano-électrique » ou encore « convertisseur analogique numérique » représentent enfin quelque chose.

Je ne remercierai jamais assez Florence Ruggiero, qui m'a aidé à traverser ces quatre dernières années qui n'ont pas toujours été de tout repos. Sa rigueur scientifique, sa grande disponibilité malgré ses nombreux engagements, son enthousiasme, sa persévérance, sa bonne humeur, ses précieux conseils et la confiance qu'elle m'a accordé, ont permis à ce projet de voir le jour et se développer. Je remercie également Florence pour son art de remotiver ses troupes quand celles-ci font face à des difficultés, notamment pendant la période de recherche de financements où je fus en proie au doute. Enfin, au-delà de son rôle de chef, qu'elle assume à merveille, Florence m'a également fait évoluer d'un point de vue personnel, en me permettant de réaliser des choses dont je ne me croyais pas capable. Merci pour tout.

Toute ma reconnaissance à Christelle Bonod-Bidaud, Dominique Le Guellec, Elisabeth Vaganay, Elise Lambert et Sandrine Bretau pour la qualité de nos discussions scientifiques (ou pas d'ailleurs), pour les bons moments passés devant une paillasse ou devant un tableau noir. Merci pour vos conseils, aussi bien professionnels que personnels, et encore merci pour votre soutien, notamment dans les moments où ça allait mal. Ce fut un plaisir d'échanger avec vous sur la cuisine, la musique, le cinéma, la condition de parent ou l'épilation.....

À Marilyne Malbouyres, la meilleure microscopiste et dégustatrice de bonbons Haribo de tous les temps. Ton apport dans les résultats obtenus est inestimable. Merci pour ces soirées, et tous les autres moments, devant le confocal, ou n'importe quel autre appareil. Je n'oublierai jamais notre thérapie basée sur l'autosatisfaction « peu importe nous sommes parfaits ! ».

Un Grand merci aux plateaux techniques. Le PRECI team : Laure, Bernard et Christophe qui m'ont permis de travailler sur le modèle du poisson zèbre dans les meilleures conditions possibles. Pour avoir partagé leur peine pendant quelques mois, je me rends compte du travail immense qu'ils fournissent. Merci à l'ensemble du personnel des plateaux de microscopie PLATIM et CTmu pour leurs compétences, leurs disponibilités et le calme dont ils font preuve avec les utilisateurs.

Aux anciens thésards du labo, Mick, Aurélie, Hannah et Muriel qui m'ont accueilli au sein de cette formidable équipe. Merci pour votre aide, votre soutien, votre exemple et pour tous ces moments de pur délire, du kidnapping de Ken à la parodie du fort IBCP en passant par la fête du string. Vos parcours professionnels, pourtant si différents, me font garder espoir en l'après thèse.

Merci aux nouveaux thésards et aux stagiaires ayant, comme Charlotte, Marc ou Bastien, posé leurs valises quelque temps parmi nous. Rachel, Emilie et Guillaume, je ne sais pas comment vous allez faire sans moi (en tout modestie bien sûre, cf : thérapie du bonheur par Malbouyres et Charvet, 2011). Grâce à vous, le soleil de l'île Maurice, de la nouvelle Calédonie et de Genay (à côté de Villefranche sur Saône) rayonne dans le labo quelle que soit la saison. Et fais moi plaisir Guillaume, commence une cure de désintoxication, Shakira ce n'est pas bon pour ta santé !

À tous les autres, ces âmes en peines qui errent ou qui ont erré avec moi dans l'institut, souvent autour d'une table ou d'un verre, Stéphanie (pour ton soutien, ta compréhension et ta bonne humeur contagieuse), Emeline, Nathalie, Carole, Anne, Romain, Géraldine et ses animaux, les Alex's, Jean-phi, Marc, Souroure (j'attends toujours le couscous), Jeff, Yoran, Ullrich, Julien (ne t'inquiète pas on sera champion), Niko, Ben, Juan, Lionel, Jérem, Mag et les autres... Je remercie en particulier l'équipe de Frédéric Mallein-Gerin sans qui cette thèse n'aurait jamais été imprimée.

J'en profite pour remercier tous les gens que j'ai rencontré à Cologne, Daniela, Claudia, Nicole, Denise, Eva, Semra, Frank, Bent, Alex (merci pour le costume de clown !), Manu, Cristian, Ann-katerin, Ivan, Lars, Nicole, Johanna et tous les membres de l'Institut für Biochimie II, pour leur accueil, leur gentillesse et pour m'avoir fait découvrir le superbe carnaval de Cologne (on se croirait à Rio avec 30 degrés de moins !).

Je tiens à remercier mes amis, certains me comprenant parfaitement pour être dans la même galère que moi, Cyrille, Fabrice, prenons exemple sur Raph, il en est sorti vivant (avec des séquelles, mais vivant). Et les autres, dont l'apport dans la réalisation de ce travail a été, sans qu'ils en aient eu réellement conscience, déterminant : Jé, BT, Flo, Tomtom, Alex, Doudou, Keizer, Vince, Manu, Aline, Amandine, Marie, les Delphines (Truc et Much), Kim, Alice, Vando, Aurél, Vinnie, Samira, Cécile (pour tout ce que tu m'as apporté), toute l'équipe des célèbres Cardinals Blues Potatoes et les autres. Je vous remercie pour votre soutien au jour le jour, pour votre amitié et pour toutes les choses qui ne sont pas définissables avec des mots. Pouvoir compter sur ses amis est inestimable.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier mes parents et mon frère. Merci pour votre soutien sans faille, de m'avoir mis dans les meilleures conditions pour réussir, pour votre confiance et de m'avoir fait grandir dans le respect des valeurs qui font de moi ce que je suis aujourd'hui (et pourtant ce n'était pas gagné !). Ce diplôme, c'est également le vôtre. J'ai une pensée pour ma grande mère, merci pour la compréhension dont tu fais preuve concernant le peu d'occasions que tu as de voir ton petit-fils. À Guido, je sais que tu me regardes de là-haut et qu'il m'arrivera des bricoles si je ne file pas droit, ciao collègue !

## Sommaire :

Liste des abréviations	11
Table des illustrations	15
introduction générale	18
<b>Introduction Bibliographique</b>	<b>21</b>
<b>I. La superfamille des collagènes</b>	<b>22</b>
<b>1. Les matrices extracellulaires</b>	<b>22</b>
<b>2. Diversité structurale des collagènes</b>	<b>24</b>
<b>3. Les FACITs</b>	<b>27</b>
3.1. Le collagène XII	28
3.1.1. Structure de la chaîne $\alpha 1$ codée par le gène <i>coll2a1</i>	28
3.1.2. Expression du collagènes XII	29
3.1.3. Les partenaires du collagène XII	30
3.2. Le collagène XXII	31
3.2.1. Structure de la chaîne $\alpha 1$ codée par le gène <i>col22a1</i>	31
3.2.2. Expression du collagènes XXII	32
<b>II. Organisation de l'appareil myotendineux</b>	<b>33</b>
<b>1. Le système musculaire</b>	<b>33</b>
1.1. Généralités morphologiques	33
1.2. Organisation anatomique et cellulaire du muscle strié squelettique	34
1.3. Les fibres musculaires striées squelettiques	34
<b>2. Le tendon</b>	<b>36</b>
2.1. Généralités	36
2.2. Organisation des tendons	37
<b>3. La jonction myotendineuse</b>	<b>39</b>
3.1. Structure de la JMT	39
3.2. Les systèmes d'ancrage myotendineux	40
3.2.1. Le complexe DAPC	40
3.2.2. Le système d'ancrage dépendant de l'intégrine	43
3.2.3. La laminine 211	43
<b>III. Développement de l'appareil myotendineux</b>	<b>45</b>
<b>1. Le développement du muscle strié squelettique</b>	<b>45</b>
<b>2. Le développement du tendon</b>	<b>47</b>
<b>3. Interdépendance muscle-tendon au cours développement</b>	<b>50</b>
<b>4. Développement de la jonction myotendineuse</b>	<b>53</b>

<b>IV. Pathologies liées à des atteintes du système musculo-tendineux</b>	<b>57</b>
<b>1. Les dystrophies musculaires congénitales (DMCs)</b>	<b>58</b>
1.1. La dystrophie musculaire congénitale à mérosine (laminine 211) négative MDC1A	58
1.2. La dystrophie congénitale d'Ullrich et la myopathie de Bethlem	59
1.2.1. <i>La dystrophie congénitale d'Ullrich</i>	59
1.2.2. <i>La myopathie de Bethlem</i>	60
1.3. La DMC avec déficit en intégrine $\alpha 7\beta 1$	61
<b>2. La myopathie de Duchenne</b>	<b>61</b>
<b>3. L'arthrogrypose ou le syndrome d'immobilité fœtale</b>	<b>63</b>
3.1. L'arthrogrypose multiple congénitale (AMC) ou classique	63
3.2. Les arthrogryposes distales	64
<b>4. Les autres acteurs impliqués dans les dystrophies musculaires</b>	<b>65</b>
<b>V. Le poisson zèbre, un puissant modèle pour l'étude du système musculo-tendineux</b>	<b>66</b>
<b>1. Généralités</b>	<b>66</b>
<b>2. La stratégie « morpholino » (knock-down)</b>	<b>67</b>
<b>3. Le myosepte vertical des poissons, un analogue anatomique du tendon des mammifères</b>	<b>69</b>
<b>4. Un système musculo-squelettique comparable</b>	<b>70</b>
<b>5. Interdépendance muscle-tendon dans le développement de la JMT du poisson zèbre</b>	<b>74</b>
<b>6. Le poisson zèbre, un modèle émergent pour les pathologies musculaires</b>	<b>76</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>80</b>
<b>I. Modèle Biologique : Poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>)</b>	<b>81</b>
1. Les lignées sauvages	81
2. Les lignées mutantes	81
3. Elevage des embryons	83
<b>II. Techniques de biologie cellulaire et développement</b>	<b>82</b>
<b>1. Stratégie Knock-Down par injection de morpholinos</b>	<b>82</b>
1.1. Détermination des morpholinos	82
1.2. Préparation des capillaires et microinjection des embryons	83
1.3. Sauvetage du morphotype	83
<b>2. Coloration au bleu Alcian</b>	<b>84</b>

---

3. Étude de la mort cellulaire	86
4. Exposition des larves à la drogue SU5402	86
5. Étude de l'expression des gènes par hybridation <i>in-situ</i>	86
5.1. Marquage des sondes à la digoxigénine-11-UTP	86
5.2. Fixation des embryons	87
5.3. L'hybridation	88
5.4. Révélation et arrêt de la réaction	89
6. Localisation des protéines par immunofluorescence et marquages fluorescents	89
6.1. Prétraitement des embryons	89
6.2. Les anticorps	90
6.3. Immunomarquages et marquages fluorescent sur embryons entiers	90
<b>III. Technique de microscopie optique et électronique</b>	<b>91</b>
1. Prises de vues des embryons	91
1.1. Stéréomicroscopie	91
1.2. Vidéo-microscopie	92
2. Observation des microstructures en microscopie électronique à transmission	92
2.1. Préparation et inclusion des échantillons	92
2.2. Coupes semi-fines et ultrafines	93
<b>IV. Méthodes de biologie moléculaire</b>	<b>93</b>
1. Extraction et purification d'ARN	93
2. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR	94
3. PCR classique	94
4. Génération de clones bactériens	95
4.1. Ligation	95
4.2. Transformation de bactéries compétentes	95
4.3. Préparation des plasmides et archivage des clones	96
<b>V. Analyses Biochimiques</b>	<b>96</b>
1. Extraction des protéines	96
2. Précipitation des protéines	96
3. Electrophorèse SDS-PAGE	97
4. Immunotransfert	97
5. Test de digestion par la collagénase	98
6. Etudes des interactions protéiques par résonance plasmonique de surface (Biacore)	98
<b>VI. Mesure de contractions musculaires</b>	<b>99</b>

---

Résultats	101
Synopsis	102
<b>I. Publication 1: The development of myotendinous junction in zebrafish</b>	<b>108</b>
<b>II. Publication 2: Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membrane</b>	<b>125</b>
Résultats préliminaires et discussion	138
<b>III. Publication 3 : Depletion of zebrafish Collagen XXII leads to muscular dystrophy by disrupting the myotendinous junction</b>	<b>145</b>
Résultats préliminaires et discussion	186
Conclusion générale et perspectives	193
Références bibliographiques	197
Annexes	218
<b>Annexe I : Table de Kimmel : étapes du développement du poisson zèbre</b>	<b>219</b>
<b>Annexe II : Liste des gènes orthologues de poisson zèbre, impliqués dans les dystrophies musculaires humaines</b>	<b>221</b>
<b>Annexe III : Tableau récapitulatif des lignées de poissons zèbres mutants mentionnées dans le manuscrit</b>	<b>223</b>

## Liste des abréviations



## Liste des abréviations

aa	Acide-aminés
AAV-V	Adeno-Associated Virus Vector
AChE	Acetylcholinestérase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	AND complémentaire
ADNg	AND génomique
AER	apical ectodermic ridges
AFM	Association Française contre les Myopathies
AMC	Arthrogrypose Multiple Congénitale
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
bHLH	Basic Helix Loop Helix
COL	Domaine collagénique
DMC	Dystrophie musculaire congénitale
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne
EGR	Early Growth Response transcription factor
EHH	Echidna hedgehog
ENU	N-éthylNitrisourea
ERK	Extracellular Regulated Kinase
EST	Express Sequence Tag
Eya	Eyes absent homolog
FACIT	Fibrils Associated Collagen with Interrupted Triple Helix
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
fmyHC	Fast myosin heavy chain

FRM	Fondation pour la Recherche Médicale
Hh	Hedgehog
IBS	Integrin Binding Site
IEC	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion
IGF	Insulin Growth Factor
ILK	Integrin Linked Kinase
JDE	Jonction Dermo-Epidermique
JMT	Jonction MyoTendineuse
JNM	Jonction neuromusculaire
JOT	Jonction OstéoTendineuse
LOs	Lysyl-Oxydases
MAP kinase	Mitogen-Activated Protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MIDAS	Metal Ion Dependant Adhesion Site
MEB	Microscope Électronique à Balayage
MEB	Microscope Électronique à Transmission
MHB	Midbrain Highbrain Boundary
MIDAS	Metal Ion-Dependent Adhesion Site
MLP	Muscle LIM Protein
MmD	Dystrophie multi/minicore
MMFs	Medial Fast Fibers
M-MLV	Moloney-Murin Leukemia Virus
MMPs	Metalloprotéinases Matricielles
MPs	Muscle Pionniers
MRF	Myogenic Regualting Factor
MET	Muliple Tissue Expression

Myf5	Myogenic factor
MyoD	Myogenic differentiation
NC	Domaine non-collagénique
N-RAP	Nebulin-Related Actin-binding Protein
NOS	Nitric Oxyde Synthase
Pax3	paired box gene 3
PBS	Phosphate Buffer Salin
PBT	PBS-Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
RT-PCR	Reverse Transcription – PCR
RYR	Récepteur aux Ryanodines
SCX	Scleraxis
Smhc	Slow myosin heavy chain
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein
Shh	Sonic Hedgehog
SSF	Superficial Slow fibers
TIMPs	Inhibiteurs des Metalloprotéinaases
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
TSPN	Thrombospondin-1 like domain
vWA	Von Willebrand factor A like domain
Wnt	Wingless

## Table des illustrations

## Table des illustrations :

Figure 1	Représentation schématique de la matrice extracellulaire	23
Figure 2	Les différentes matrices extracellulaires	23
Figure 3	Représentation spatiale de la structure de la chaîne $\alpha$ et de la triple hélice collagénique	25
Figure 4	Les 28 collagènes répertoriés, leur stoechiométrie et leur principale distribution tissulaire	26
Figure 5	Structure des FACITs	27
Figure 6	représentation schématique des chaînes $\alpha 1(XII)$ forme longue et courte	29
Figure 7	Modèle d'assemblage supramoléculaire inter fibre	30
Figure 8	Représentation schématiques des chaînes $\alpha 1(XXII)$ et $\alpha 1(XXI)$	31
Figure 9	Du muscle au sarcomère	35
Figure 10	Organisation du tendon	37
Figure 11	Structure de la JMT	40
Figure 12	Les laminines	41
Figure 13	Schématisation des systèmes d'ancrage du cytosquelette musculaire sur la MEC	42
Figure 14	Les intégrines	44
Figure 15	Modèle de la myogenèse aviaire	46
Figure 16	Les quatre compartiments somitiques	48
Figure 17	Organisation schématique des progéniteurs musculaire, tendineux et cartilagineux durant le développement des membres du poulet (E3.5)	52
Figure 18	Développement de la JMT	56
Figure 19	Exemple de caractéristiques arthrogrypales	64
Figure 20	Mode d'action des différents types de morpholinos	68
Figure 21	Structure du myosepte vertical	71

Figure 22	Représentation schématique de myotome de poisson zèbre	73
Figure 23	Implication du myosepte vertical dans la régulation de la taille des fibres musculaires	75
Figure 24	Contrôles des expériences de sauvetage du morphotype par injection de protéines	85
Figure 25	Schéma de l'appareillage nécessaire à la mesure des contractions musculaires	100
Figure 26	Western blot anti-collagène XII sur extraits d'embryons sauvages et injectés avec le MO12	139
Figure 27	Analyse morphotypique des embryons injectés avec 13 ng de MO12a ou MO12b	140-141
Figure 28	Observation du cartilage par coloration des glycosaminoglycane au bleu alcian	143
Figure 29	Comparaison des séquences des domaines vWA des protéines humaines CMG2 et collagène XXII	187
Figure 30	Détection d'interactions entre le vWA22 de poisson zèbre et les laminines de souris (A) ou entre le vWA22 et le collagène VI humain (B)	188
Figure 31	Proposition d'un modèle hypothétique du rôle structural du collagène XXII au sein de la JMT	189
Figure 32	Co-injection du MO22 et des régions recombinantes de fixation aux intégrines du collagène XXII	191
Figure 33	Coloration au bleu Alcian des structures cartilagineuses d'embryons sauvages et MO22 de 5dpf	192
Tableau 1	Cinétique d'apparition de différents composants de la JMT durant le développement embryonnaire du poulet	57
Tableau 2	Tableau récapitulatif des différentes sondes utilisées	87
Tableau 3	Liste des couples d'amorces utilisés	95

# Introduction générale

## Introduction générale :

Chez les organismes pluricellulaires, le terme de « matrice extracellulaire » (MEC) regroupe l'ensemble des éléments situés dans l'environnement immédiat des cellules. Les principales macromolécules de la MEC sont les collagènes ; les protéoglycannes, les protéines adhésives et élastiques, et l'acide hyaluronique. Elles forment des réseaux moléculaires complexes qui diffèrent selon la fonction du tissu : le réseau peut être dense et résistant comme dans l'os, fin et souple comme dans les fascias ou transparent comme dans la cornée. La nature des molécules, ainsi que leur proportion relative, varient en fonction des tissus et est adaptée aux propriétés biomécaniques de chacun d'eux. Longtemps définie comme une structure assurant le maintien et la cohésion des tissus, la MEC est aujourd'hui considérée comme un acteur majeur dans de nombreux événements physiologiques comme dans le développement en régulant la migration, prolifération, différenciation des cellules, la biodistribution de facteurs de croissance et dans la cicatrisation. Une altération d'un de ces composants due à des mutations sur les gènes de la MEC ou une dérégulation de leur synthèse, conduit à l'apparition de maladies affectant un large répertoire de tissus quelles soient héréditaires comme les syndromes Elher-Danlos, l'ostéogénèse imparfaite, l'épidermolyse bulleuse ou encore certaines myopathies, ou acquises comme les fibroses et le cancer.

Les collagènes, présents chez les animaux même les plus primitifs, constituent un groupe à part entière parmi les macromolécules de la MEC. Ce sont aussi les plus représentés dans les tissus. 28 différents types de collagènes (numérotés en chiffre romain dans l'ordre de leur découverte) constituent à ce jour cette super famille de protéines, qui ont été regroupés en sous famille selon leur signature structurale ou leur capacité à former des agrégats supramoléculaires spécifiques comme les fibres striés par exemple, Parmi ces sous familles figurent les FACITs (Fibrils Associated Collagens with interrupted Triple helix) qui comprend 8 membres, les collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et le dernier décrit, le collagène XXII dont la fonction



*in vivo* n'est pas connue (Koch *et al.*, 2004). Ces collagènes ont pour caractéristique de favoriser les interactions protéines/protéines dans les tissus.

Notre laboratoire s'intéresse à l'étude des matrices extracellulaires et en particulier à la biologie et pathologie des collagènes. Les collagènes sont de larges molécules trimériques, multifonctionnelles et leur étude tant au niveau structural que fonctionnel est difficile à mettre en œuvre. Le laboratoire réalise en parallèle une approche *in vitro* par production recombinante des domaines d'intérêts couplée à l'identification de leurs partenaires cellulaires et moléculaires, et *in vivo* par modulation de leur expression dans des modèles animaux : la souris et plus récemment le poisson zèbre.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à comprendre la fonction du collagène XXII *in vivo*. Ce collagène, conservé chez les vertébrés, est exprimé aux jonctions tissulaires, en particulier à la jonction myotendineuse. Il a été décrit pour la première fois chez les mammifères en 2004 (Koch *et al.*, 2004) mais sa fonction n'avait toujours pas été élucidée. J'ai donc entrepris de réaliser une étude chez le poisson zèbre utilisant une approche anti-sens, « morpholino knock-down ». La localisation unique de ce collagène fait de lui un marqueur de choix pour étudier la formation de la jonction myotendineuse, structure souvent négligée par les biologistes, et analyser les conséquences de son absence sur l'attachement du muscle sur le tendon.

# Introduction bibliographique

## **I. La super famille des collagènes :**

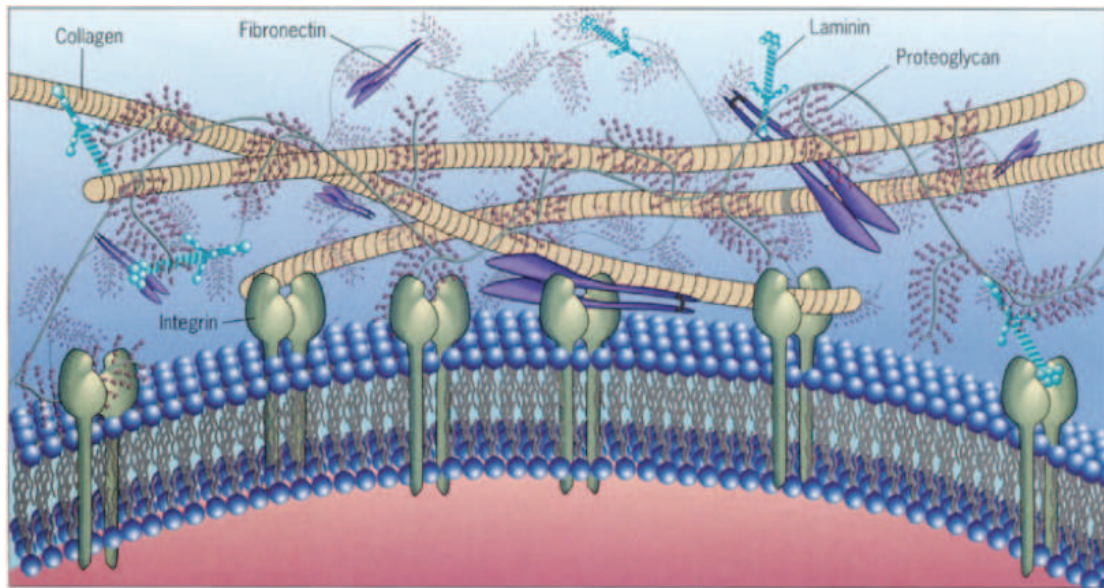
### **1. Les matrices extracellulaires (MECs) :**

La présence d'une MEC est l'une des caractéristiques des organismes multicellulaires. Cette dernière forme un réseau protéique extrêmement complexe (figure 1) qui assure, en premier lieu, aux cellules conjonctives, épithéliales, musculaires et nerveuses un support structural responsable de la cohésion des tissus. La composition et l'organisation de la MEC déterminent les propriétés mécaniques mais aussi fonctionnelles des tissus. Ces tissus peuvent être liquides (liquide interstitiel ou synovial), fibreux (tendon) ou encore solides (os, dent).

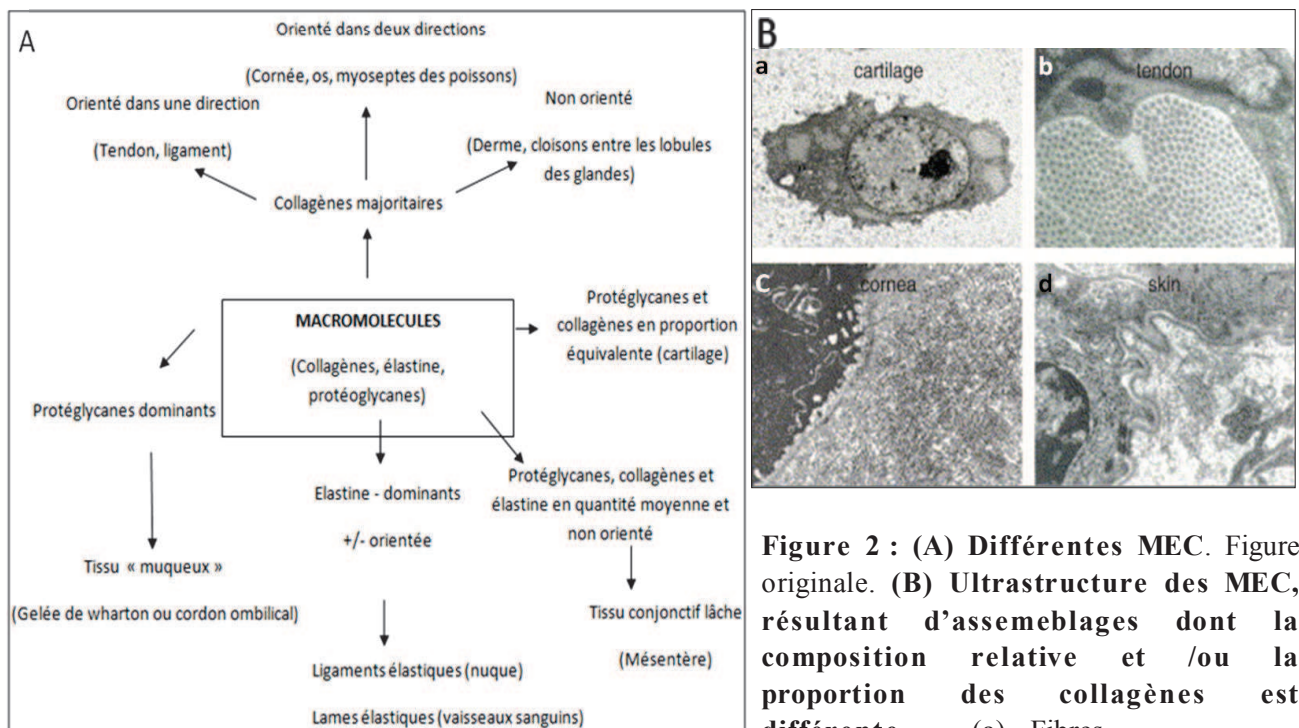
La MEC est constituée de protéines structurales dont les principaux représentants sont les collagènes et l'élastine, ces deux macromolécules étant capables de s'organiser en agrégats supramoléculaires. La matrice contient également des glycoprotéines regroupées sous le terme de protéines adhésives (fibronectine, laminines, ténectines,...) et des protéoglycanes. Ces différents composants interagissent avec des récepteurs membranaires, comme notamment les intégrines, et peuvent ainsi déclencher des réponses cellulaires variées. De plus, cet environnement contient des enzymes impliquées dans la maturation (Lysyl oxydases) et la dégradation (finement régulée par les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs) des constituants matriciels et des facteurs de croissance (FGF, VEGF, TGF $\beta$ ,...).

La MEC est composée d'un grand nombre de macromolécules, proposant de multiples combinaisons structurales qui lui permettent d'assurer des fonctions très variées (figure 2). Ainsi, la MEC peut être minéralisée et former des structures extrêmement dures tel que l'os ou la dent. Elle peut constituer, dans la cornée, des structures transparentes (résultant d'un assemblage en contre plaqué des fibres de collagènes) ou adopter une structure en câble adaptée à la remarquable résistance mécanique des tendons, où toutes les fibres de collagènes sont parallèles les unes aux autres.

Les lames basales, interfaces entre les tissus conjonctifs et les autres tissus (épithéliaux, nerveux et musculaires) sont également composées de protéines structurales. Cette structure spécialisée joue un rôle primordial dans l'ancrage des cellules, le contrôle de l'adhérence, la migration cellulaire et la réparation tissulaire.



**Figure 1 : Représentation schématique de matrice extracellulaire.** Diversité des composants de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycans, laminines, fibronectine,...) et leur association aux membranes cellulaires.



**Figure 2 : (A) Différentes MEC.** Figure originale. **(B) Ultrastructure des MEC,** résultant d'assemblages dont la composition relative et /ou la proportion des collagènes est différente. (a) Fibres

fines, non orientées du cartilage (collagènes II/IX et XI). (b) Grandes faisceaux de fibres orientées parallèlement dans le tendon (collagène I, faiblement III et V). (c) Arrangement orthogonaux de fines fibres au diamètre régulier dans la cornée (collagène V). (d) Fibres hétérogènes dans le derme (collagène I, III et faiblement V). D'après Ricard Blum et Ruggiero, 2005.

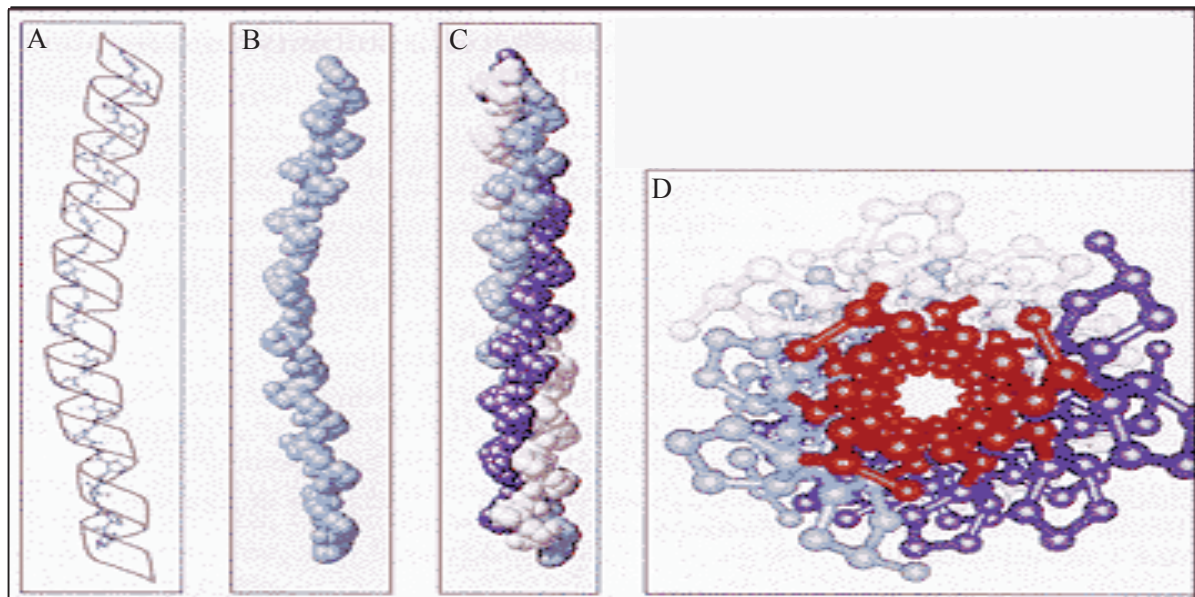
## 2. Diversité structurale des collagènes :

Les collagènes sont les composants majoritaires de la MEC, ils représentent le quart de la masse protéique chez l'Homme. Le terme de « collagène » définit une super famille de 28 membres codés par 46 gènes distincts (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005 ; Viet *et al.*, 2006, Fitzgerald *et al.*, 2008). Les collagènes sont des molécules trimériques composées de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$  identiques (homotrimères) ou différentes (hétérotrimères), qui contiennent des domaines collagéniques (COL) caractérisés par la répétition de la séquence d'acide aminés [Gly-X-Y] où X est essentiellement une proline et Y souvent une hydroxyproline. Tous les collagènes contiennent au moins un domaine COL dans leur structure primaire et, dans la grande majorité, sont capables de s'organiser en agrégats supramoléculaires (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005). Ces motifs répétés permettent l'enroulement des chaînes  $\alpha$  autour d'un axe commun avec un décalage de 0,3nm pour former une triple hélice, caractéristique structurale de la superfamille des collagènes (figure 3) (Beck and Brodsky, 1998 ; Brodsky *et al.*, 2005). La formation de la triple hélice favorise les interactions latérales en projetant à la surface de la molécule les acides aminés en position X et Y. Dans 70% des cas, ces acides aminés ne sont pas impliqués dans la stabilisation de la triple hélice (Brodsky and Persikov, 2005). De plus, cette dernière fournit une structure rigide qui sépare les domaines non-collagéniques (NC), d'une grande diversité, aussi bien d'un point de vue structural que du point de vue de leur taille. Ces domaines peuvent varier d'une dizaine d'acides aminés pour les régions charnières à plus d'une centaine pour les motifs fonctionnels, souvent localisés à l'extrémité N-terminal de la molécule.

Les domaines COL sont communs à tous les collagènes et constituent leur signature, il existe toutefois une grande diversité structurale entre les différents types de collagènes. Ils diffèrent par la taille et le nombre des domaines COL, leur composition et leur assemblage supramoléculaire (figure 4). On distingue deux grandes sous-familles, les collagènes fibrillaires et non fibrillaires. Les collagènes fibrillaires (collagènes I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII) (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005) sont caractérisés par une triple hélice ininterrompue de 300 nm de long. Ils ont également la capacité de former des fibres à striation périodique dans les espaces extracellulaires. Les collagènes non-fibrillaires, qui comprennent une succession de domaines COL courts et interrompues qui peuvent former des arrangements moléculaires comme l'arrangement en réseau hexagonal du collagène IV. Il



est à noter qu'un nouveau gène, *col29a1*, codant pour le collagène XXIX a été récemment décrit (Söderhall *et al.*, 2007) avant d'être finalement identifié comme une nouvelle chaîne du collagène VI, *col6a5* (Gara *et al.*, 2008). Parmi les collagènes non fibrillaires, notons que certains collagènes sont transmembranaires (collagènes XIII, XVII, XXIII, XXV). Ceux-ci contiennent des domaines collagéniques extracellulaires qui peuvent être clivés et libérés dans la MEC pour remplir une fonction différente de celle des molécules entières. La sous-famille des FACITs (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix), est le groupe le plus fourni avec 8 membres identifiés aujourd'hui. Nous reviendrons sur ce groupe dans le chapitre qui suit.



**Figure 3 : Représentations spatiales de la structure de la chaîne  $\alpha$  (A,B) et de la triple hélice collagénique (C,D) :** A,B : chaîne  $\alpha$  constituée d'une répétition de triplets Gly-X-Y. C : vue latérale de la triple hélice. D : vue transversale de la triple hélice. On retrouve au centre de l'hélice les résidus de Glycine (rouge).

Les collagènes sont des protéines modulaires et de nombreuses études se sont intéressées aux fonctions biologiques des différents domaines qui les constituent, en particulier les domaines capables de réguler l'angiogenèse. En effet, les membres de la famille des multiplexines (collagènes XV et XVIII) présentent des domaines C-terminaux, respectivement nommés restine (XV) et endostatine (XVIII) possédant de puissantes activités anti-angiogéniques et anti-tumorales (Boehm *et al.*, 1997 ; Ramchandran *et al.*, 1999). L'endostatine est d'ailleurs commercialisée comme médicament anti-tumoral sous le nom

Collagènes fibrillaires			FACITs		
I	$\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)$	ubiquitaire	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	associé au collagène II
	$\alpha 1(I)_3$	embryonnaire	XII	$\alpha 1(XII)_3$	associé au collagène I
II	$\alpha 1(II)_3$	cartilage, humeur vitrée	XIV	$\alpha 1(XIV)_3$	associé au collagène I
III	$\alpha 1(III)_3$	ubiquitaire	XVI	$\alpha 1(XVI)_3$	JDE, cartlage
V	$\alpha 1(V)_2\alpha 2(V)$	ubiquitaire	XIX	$\alpha 1(XIX)_3$	cerveau
	$\alpha 1(V)_3$	embryonnaire	XX	$\alpha 1(XX)_3 ?$	cornée
	$\alpha 1(V)_2\alpha 4(V)$	SNP (rat)	XXI	$\alpha 1(XXI)_3$	embryon (cœur, rein, muscle)
	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	placenta	XXII	$\alpha 1(XXII)_3$	jonctions tissulaires
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	humour vitré			
XXIV	$\alpha 1(XXIV)_3$	os, cornée			Multiplexines
XXVII	$\alpha 1(XXVII)_3$	cartilage	XV	$\alpha 1(XV)_3$	lame basale
			XVIII	$\alpha 1(XVIII)_3$	lame basale
XIII	$\alpha 1(XIII)_3 ?$	os, cartilage, peau, muscle			
XVII	$\alpha 1(XVII)_3 ?$	JDE			Autres collagènes
XXIII	$\alpha 1(XXIII)_3 ?$	Nombreux tissus, cancer de prostate	VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	filaments perlés
XXV	$\alpha 1(XXV)_3$	neurones, plaques amyloïdes	VII	$\alpha 1(VII)_3$	JDE
			XXVI	$\alpha 1(XXVI)_3 ?$	ovaire, testicule
IV	$\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$	lame basale	XXVIII	$\alpha 1(XXVIII)_3 ?$	tissu nerveux, il possède des caractéristiques des FACITs
	$\alpha 3(IV)_2\alpha 4(IV)$	rein, muscle lisse			

26

### 3. Les FACITs :

La sous-famille des FACITs regroupe à ce jour les collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII. Comme l'acronyme l'indique, ce sont des collagènes aux domaines COL interrompus par de courts domaines NC. Les FACITs sont capables de s'associer aux collagènes fibrillaires (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005). Les interruptions de leur triple hélice procurent des points de flexibilité à la molécule. Les FACITs présentent une signature structurale caractérisées par la présence de deux imperfections du triplet [Gly-X-Y] dans le domaine COL1 et de deux cystéines séparées par quatre acides aminés (CxxxxC) à la jonction entre les domaines NC1 et COL1. Ce motif serait nécessaire à l'initiation de la trimérisation des chaînes (Mazzorana *et al.*, 2001). De plus, tous les FACITs possèdent au moins un sous-domaine « Thrombospondin-1 like domain » (TSPN) au sein de leur domaine NC N-terminal (figure 5).

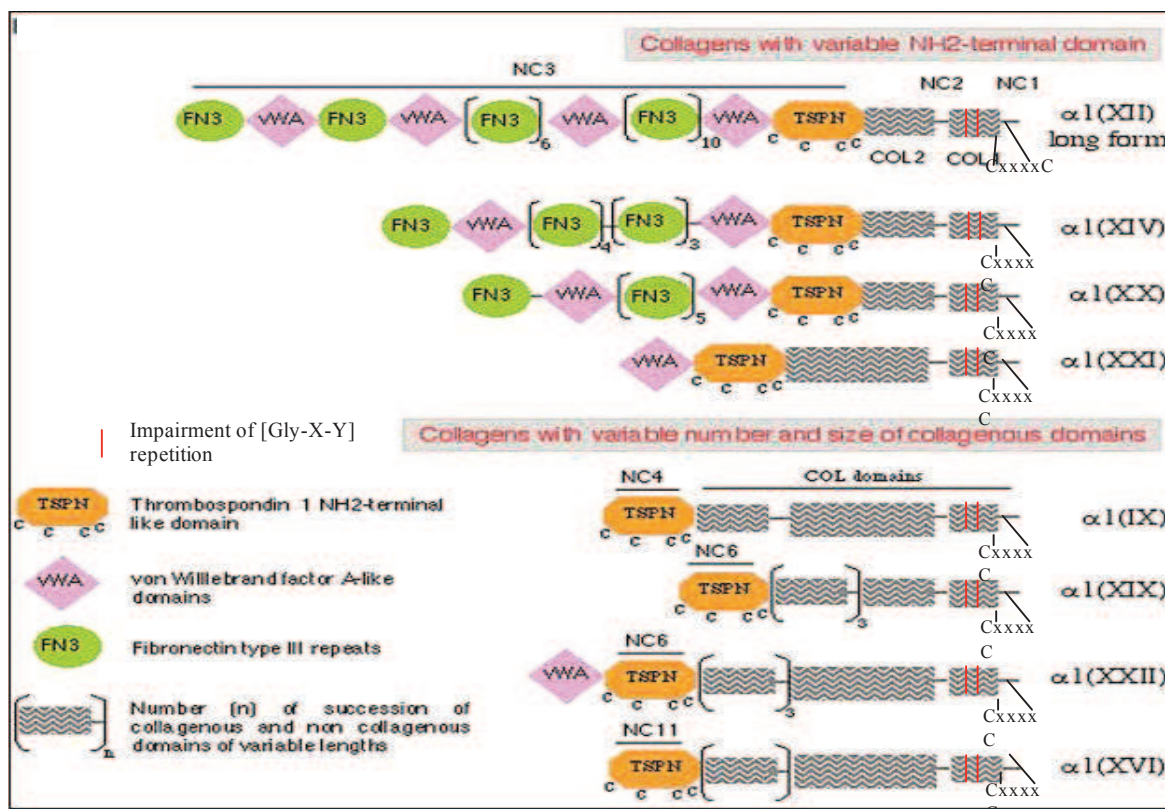


Figure 5 : Structure des FACITs : D'après Ricard-Blum et Ruggiero, 2005.

La première fonction évoquée par le terme « Fibrillar Associated Collagen » des FACITs n'est aujourd'hui démontrée que pour les collagènes IX, XII et XIV qui sont



retrouvés à la surface des collagènes fibrillaires et sont liés aux fibres de manière covalente ou non-covalente. L'association des FACITs avec les fibres de collagène peut dépendre du contexte tissulaire, c'est le cas du collagène XVI qui s'associe avec les fibres hétérotypiques II/XI dans la matrice cartilagineuse et ne s'associe pas aux fibres collagéniques, mais aux microfibrilles élastiques composées de fibrilline-1, dans le derme papillaire (Kassner *et al.*, 2003). Enfin, le collagène XIX est capable à la fois de créer des liens structuraux entre les fibres de collagène et d'autres partenaires matriciels (Boudko *et al.*, 2008), mais aussi de s'assembler en oligomères au niveau des lames basales et des tissus conjonctifs interstitiels (Meyers *et al.*, 2003). La présence de FACITs associés aux fibres de collagène peut réguler la fibrillogénèse. C'est le cas des collagènes XII et XIV qui régulent le diamètre des fibres de collagène I (Koch *et al.*, 1995).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux collagènes XII et XXII qui font l'objet de cette étude.

### 3.1. Le collagène XII :

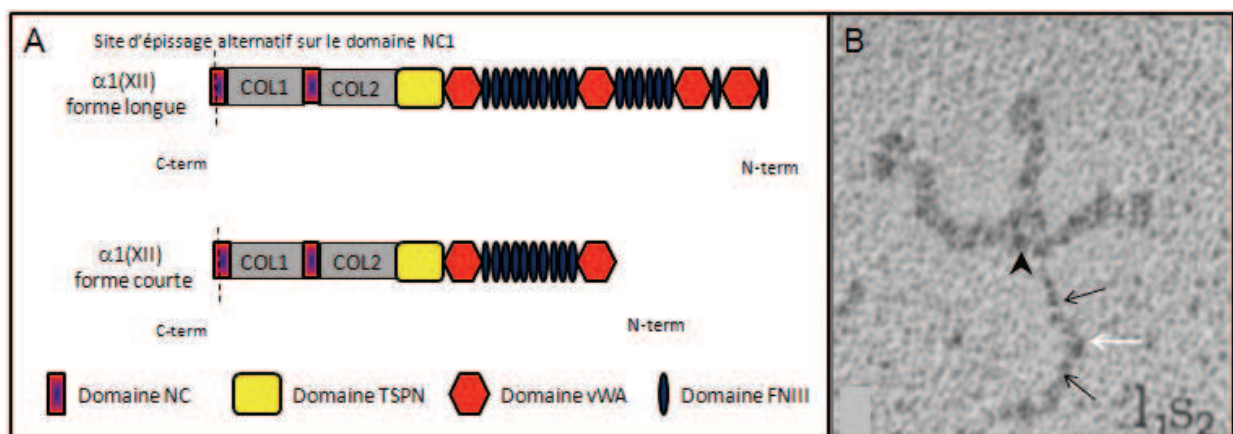
#### 3.1.1. Structure de la chaîne $\alpha 1$ codée par le gène *coll2a1*:

Le collagène XII est un homotrimère composé de trois chaînes  $\alpha 1$ (XII). La chaîne  $\alpha$  du collagène XII, de structure très proche de celle du collagène XIV, ne possède que deux domaines COL et un très long domaine NC3 composé d'un sous-domaine TSPN suivi d'une succession (10 à 18) de domaines fibronectine de type III (FNIII) entrecoupés de domaines von villebrand facteur like (vWA) (2 à 4) (Gordon *et al.*, 1989) (Figure 6). Il existe deux isoformes du collagène XII issues d'un épissage alternatif de l'ARNm : la forme longue (COLXIIA) et la forme courte (COLXIIB). La différence entre ces deux chaînes réside dans la suppression d'une partie du domaine NC3 (Figure 6). La différence de masse moléculaire entre les deux isoformes est de près de 100KDa. Cette grande différence ne s'explique pas uniquement par l'absence d'une partie du domaine NC3. Les modifications post-traductionnelles, qui correspondent à un ajout de chaînes de chondroïtine sulfate, qui sont uniquement réalisées sur la forme longue (Ricard-Blum *et al.*, 2000). Le collagène XII peut également subir un épissage alternatif supprimant une partie du domaine NC1. Cette variation

pourrait entraîner des différences dans les interactions protéiques impliquant les domaines NC1 et COL1. Il existe donc quatre variants possibles, notés colXIIA-1, colXIIA-2, colXIIB-1, colXIIB-2. *In vivo*, il est également possible de retrouver des hétérotrimères colXIIA-1/colXIIA-2 (Koch *et al.*, 1995). Cette grande variabilité rend difficile l'étude de la fonction de ce collagène.

### 3.1.2. Expression du collagène XII:

Le patron d'expression du collagène XII a été étudié chez le poulet, la souris et l'humain. Les résultats montrent que le profil d'expression est conservé entre ces espèces. Ce collagène est produit par les fibroblastes et il est retrouvé à la surface des fibres de collagène I dans le derme, le tendon, autour des vaisseaux sanguins et autour des os (Keene *et al.*, 1991 ; Koch *et al.*, 1995 ; Boehme *et al.*, 1995 ; Viet *et al.*, 2006). Durant l'embryogénèse, le collagène XII est localisé à l'interface des lames basales et du tissu conjonctif (Thierry *et al.*, 2005).



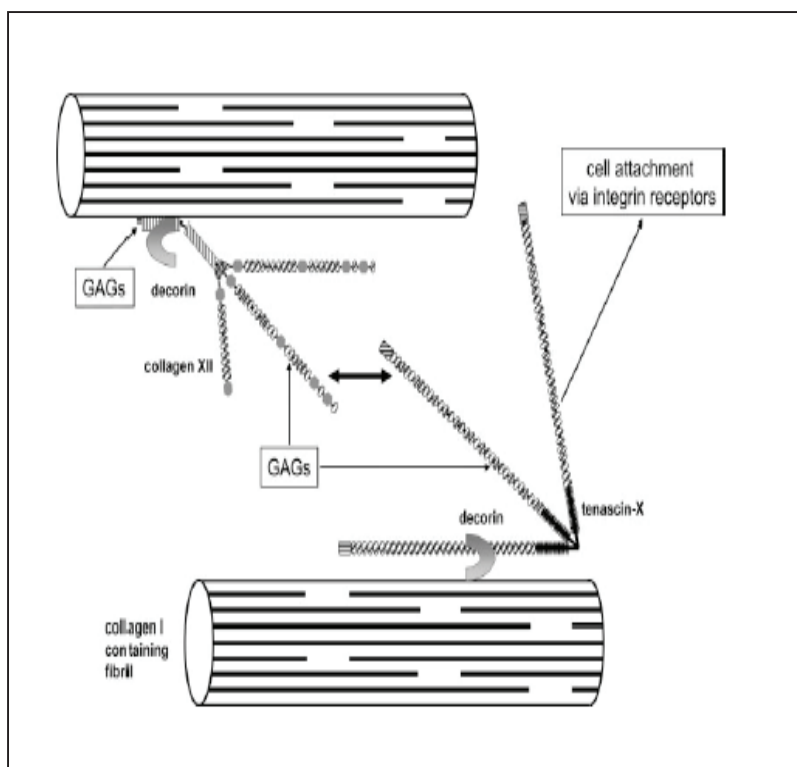
**Figure 6 : (A) représentation schématique des chaînes  $\alpha 1(XII)$  forme longue et courte (d'après Bader *et al.*, 2009). (B) Molécules recombinantes de collagène XII (variant colXII-A2) purifiées et observées microscopie électronique après ombrage tournant : (B) la triple hélice du collagène XII (flèches noires) possède un point de flexibilité correspondant au domaine NC2 (flèche blanche). Les domaines NC3 sont arrangés en croix et le site d'interaction se fait au niveau du domaine globulaire TSPN (tête de flèche). D'après Koch *et al.*, 2005.**

### 3.1.3. Les partenaires du collagène XII:

Comme nous l'avons vu, le collagène XII est retrouvé à la surface des fibres de collagène I. Une première étude décrit une interaction indirecte entre le collagène XII et les fibres de collagène I impliquant les chaînes glycosaminoglycanes (GAGs) de la décorine ou de la fibromoduline (Font *et al.*, 1996). Il a également été montré que le collagène XII interagit avec la ténascine-X permettant la formation d'un complexe protéique réunissant 2 fibres de collagène entre elles. Ce réseau multiprotéique permettrait le glissement des fibres entre elles et donc aurait un rôle important dans les propriétés biomécaniques des tissus (figure 7) (Veit *et al.*, 2006).

Cependant, des données divergentes ont été obtenues concernant l'interaction du collagène XII avec les fibres collagène I. Le collagène XII pourrait interagir de façon directe avec les fibres collagène I en enchâssant ses domaines COL dans les fibres de collagène I durant la fibrillogénèse (Koch *et al.*, 1995). Il n'est pas exclu qu'*in vivo*, les deux types d'interactions directs ou indirects soient fonctionnels (Keene *et al.*, 1991 ; Font *et al.*, 1996).

En revanche, il n'existe aucune donnée concernant une interaction directe entre le collagène XII et les cellules.



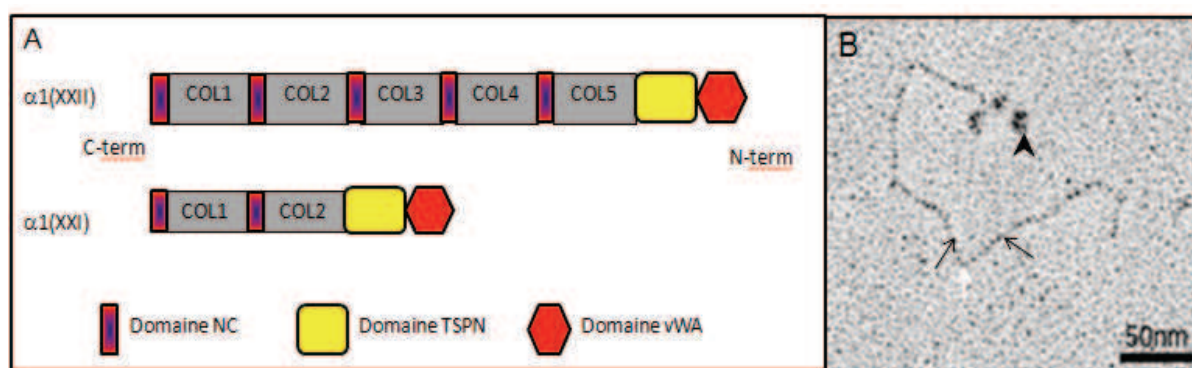
**Figure 7 : Modèle d'assemblage supramoléculaire inter fibre :** Le collagène XII (comme la ténascine X) sont des adaptateurs moléculaires qui permettent d'interconnecter et d'espacer les fibres de collagène I. Cette organisation influence les propriétés biomécaniques du tissu. Le collagène XII et la ténascine X peuvent interagir indirectement avec les fibres de collagène I par l'intermédiaire de la décorine (l'hypothèse de l'interaction directe n'est pas présentée ici). Les domaines NC3 du collagène XII et les bras de la ténascine X sont capables d'interagir avec les glycoaminoglycanes (GAGs) et donc de lier d'autres partenaires matriciels. D'après Veit *et al.*, 2006.

### 3.2. Le collagène XXII :

#### 3.2.1. Structure de la chaîne $\alpha 1$ codée par le gène *col22a1* :

Le collagène XXII est un homotrimère composé de trois chaînes  $\alpha 1$ (XXII). La chaîne  $\alpha$  du collagène XXII est composée de cinq domaines COL, entrecoupés de six domaines NC. Son domaine NC6, relativement court, est composé de deux sous-domaines : TSPN et vWA (Figure 8).

La structure de la chaîne  $\alpha 1$ (XXII) est très proche de la chaîne  $\alpha$  d'un autre FACIT, le collagène XXI (figure 8) (Tuckwell, 2002 ; Chou et Li, 2002) mais celui-ci ne comporte que les deux premiers domaines COL du collagène XXII. L'homologie entre leurs domaines vWA est de 43%, cette variation a été suffisante pour produire des anticorps polyclonaux spécifiques du collagène XXII. Chez l'Homme, il a été montré par RT-PCR et MTE-blot (Multiple Tissue Expression) que le collagène XXI était exprimé dans le cœur, l'estomac, le rein, le muscle squelettique et le placenta (Fitzgerald et Bateman, 2001 ; Chou et Li, 2002) alors que le collagène XXII n'est présent qu'aux jonctions tissulaires. De plus, le collagène XXI n'a pas été retrouvé dans le génome de la souris, ni dans celui du poisson zèbre (Koch *et al.*, 2004).



**Figure 8 : (A) Représentation schématisques des chaînes  $\alpha 1$ (XXII) et  $\alpha 1$ (XXI)** (figure originale). **(B) Molécules recombinantes de collagène XXII purifiées et observées en microscopie électronique après ombrage tournant :** (B) Les bâtonnets du collagène XXII correspondent aux domaines en triple hélice (flèches noires). Les coudes observés dans cette structure correspondent aux domaines non collagéniques charnières (flèches blanches). Les domaines globulaires correspondent aux domaines non collagéniques N-terminaux (tête de flèches). D'après Koch *et al.*, 2004.

### 3.2.2. Expression du collagène XXII:

Il n'existe à ce jour qu'un seul article décrivant le collagène XXII (Koch *et al.*, 2004). Chez la souris, ce collagène, présent aux jonctions tissulaires, notamment à la jonction myotendineuse (JMT), est exprimé par les cellules musculaires squelettiques uniquement. Il est déposé spécifiquement à la membrane basale des cellules musculaires à leur point d'ancrage sur la JMT. Contrairement à la plupart des FACITs, il ne co-localise pas avec les fibres de collagène I. Il est aussi bien exprimé au stade embryonnaire qu'à l'âge adulte.

### 3.2.3. Les partenaires du collagène XXII:

Il a été montré que le collagène XXII pouvait interagir directement avec la lignée de kératinocyte HACAT et la lignée fibroblastique WI 26. L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , principal récepteur des collagènes fibrillaires, notamment du collagène I, serait responsable de cette interaction (Koch *et al.*, 2004).

Le domaine NC6 du collagène porte un sous-domaine vWA, connu pour médier des interactions protéines/protéines (Lacy *et al.*, 2004). Ces interactions sont médiées par le motif MIDAS (Metal Ion-Dependant Adhesion Site) du domaine vWA et sont dépendantes des ions divalents, notamment du  $Mg^{2+}$  (Lacy *et al.*, 2004).

Il n'y a, pour l'instant, pas de données concernant la fonction *in vivo* pour les collagènes XII et XXII. Leur présence au niveau des lames basales, ainsi qu'à la surface du collagène I pour le collagène XII, indique que ces deux FACITs seraient capables de servir de pont protéique entre les lames basales et les fibres de collagène ou d'autres composants matriciels des tissus conjonctifs.

## **II. Organisation de l'appareil myotendineux :**

La revue proposée ici a pour but de décrire l'organisation structurale ainsi que le développement de la jonction myotendineuse (JMT). Cette jonction est spécialisée dans l'ancrage du muscle sur la matrice tendineuse et permettant la transmission des forces musculaires au tendon. Elle résulte d'une coopération à la fois morphologique et signalétique entre le muscle et le tendon. C'est pourquoi une brève description des systèmes musculaires et tendineux sera faite avant d'aborder la JMT.

### **1. Le système musculaire :**

#### **1.1 Généralités morphologiques :**

Les muscles représentent 40 à 50% du poids total du corps humain. Ils constituent des systèmes de contractions considérés comme « moteurs » de l'organisme. Ils sont en effet capables de produire une énergie mécanique à partir d'une énergie chimique avec un remarquable rendement.

Il existe trois types de muscles : le muscle cardiaque, le muscle strié squelettique et le muscle lisse. Le muscle cardiaque et le muscle lisse sont soumis à un contrôle involontaire exercé par le système nerveux végétatif alors que les muscles squelettiques sont soumis à un contrôle volontaire sous contrôle du système nerveux central (SNC). Le muscle cardiaque est capable de contractions rythmées et continues qui permettent le pompage régulier du sang. Les muscles lisses tapissent certains organes internes comme l'intestin, le colon, les gros vaisseaux sanguins et permettent des contractions longues et soutenues. Les muscles squelettiques, pour leur part, génèrent des forces capables d'actionner les structures osseuses par l'intermédiaire des tendons (système articulaire). Ils vont donc jouer un rôle central dans la locomotion mais vont également permettre aux organismes de contrôler et modifier leur environnement en saisissant et déplaçant des objets par exemple. Parmi les muscles squelettiques du tronc, certains ne génèrent pas de mouvement articulaire mais ont un rôle de soutien, c'est le cas des muscles abdominaux, reliés entre eux par une fine bande de tissu tendineux.

## 1.2. Organisation anatomique et cellulaire du muscle strié squelettique :

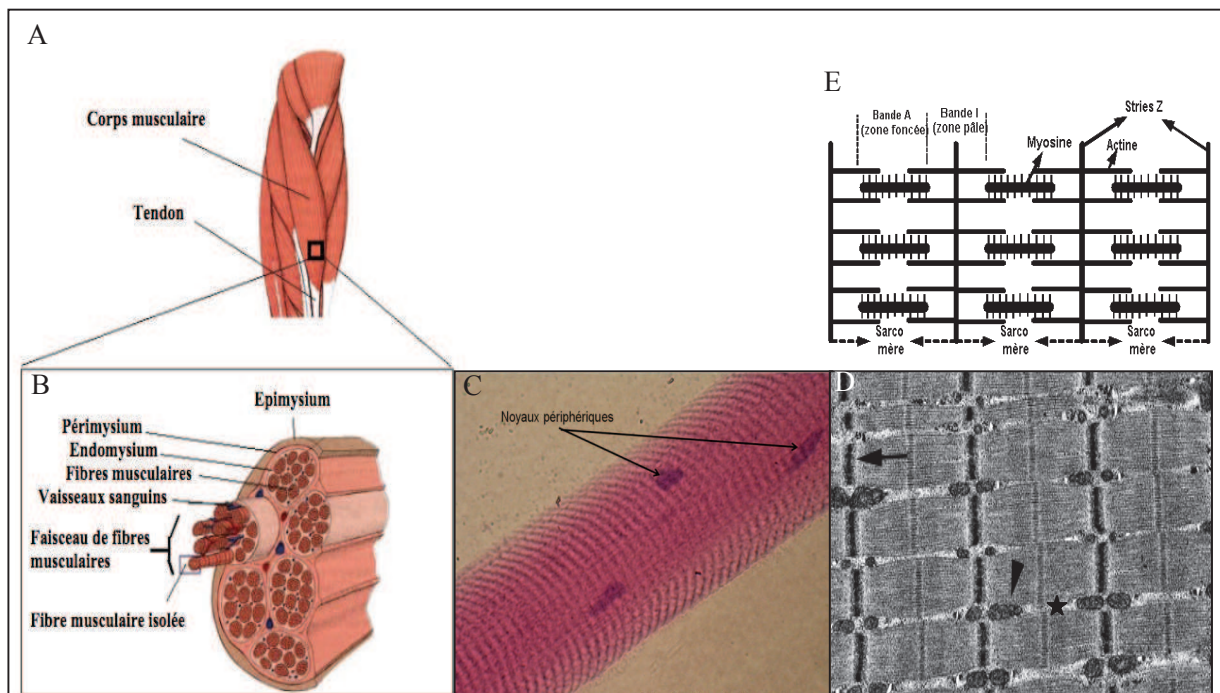
Le système musculaire strié squelettique est constitué de faisceaux musculaires, de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses. Les faisceaux musculaires sont entourés d'un tissu conjonctif résistant où se trouvent les vaisseaux sanguins (artérioles et veinules) qui irriguent le muscle. Ce tissu est appelé le périmysium. L'endomysium quand à lui est un tissu conjonctif fin et souple qui entoure chaque fibres musculaires, on y retrouve des capillaires dérivés de vaisseaux sanguins présents dans le périmysium. Ce réseau entoure chaque fibre musculaire (figure 9). Enfin, tout le muscle est lui-même entouré d'une gaine conjonctive blanchâtre et fibreuse, l'aponévrose ou l'épimysium, qui permet aux muscles de glisser les uns contre les autres. Les aponévroses sont inextensibles. Elles soutiennent les fibres musculaires et leur imposent un axe de contraction en harmonie avec l'orientation des fibres de collagènes qui composent les tendons auxquels est rattaché le muscle.

Le muscle strié squelettique n'est pas uniquement composé de cellules musculaires. En effet, en plus des cellules satellites qui sont capables de se différencier et fusionner aux fibres musculaires pour les régénérer, on trouve des cellules endothéliales, immunitaires, vasculaires, des fibroblastes et des neurones (De Castro Rodriguez et Schmalbruch., 1995).

## 1.3. Les fibres musculaires striées squelettiques :

Les fibres musculaires striées sont des syncytia plurinucléés issus de la fusion de myoblastes, cellules précurseurs du muscle strié. Elles se présentent comme de longs et fins fuseaux de 10 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une longueur pouvant aller jusqu'à 30 cm chez l'Homme. Chaque fibre peut contenir plusieurs centaines de noyaux localisés en position périphérique. Elle est entourée d'une robuste membrane plasmique, le sarcolemme (figure 9 A), l'ensemble constituant une architecture à très grande résistance mécanique. Le cytoplasme des cellules musculaires est appelé sarcoplasme. On y retrouve les myofibrilles, alignées en faisceaux, qui occupent presque la totalité du volume de la fibre musculaire. Les myofibrilles sont de grands cylindres présentant une striation transversale périodique caractéristique. Elles sont orientées dans la longueur de la fibre et ont un diamètre de 1 à 3  $\mu\text{m}$ .





**Figure 9 : Du muscle au sarcomère :** Représentations schématiques (A) de l'organisation tendino-musculaire d'un membre inférieur humain, d'après Drake *et al.*, 2006. (B) Muscle strié squelettique composé de fibres musculaires organisées en faisceaux, d'un système vasculaire et d'un réseau matriciel entourant le muscle : l'épimysium ; le faisceau de fibres musculaires : le périmysium et les fibres musculaires : l'endomysium. (C) Cliché de microscopie optique d'une fibre musculaire colorée à l'hématoxyline-éosine. La fibre musculaire est une cellule plurinucléée, les noyaux ont une localisation sous-membranaire périphérique. Les striations périodiques clairement visibles correspondent aux stries Z sarcomériques. (D et E) Cliché de microscopie électronique à transmission (MET) et schéma représentant une partie de cellule musculaire en coupe latérale. L'unité fonctionnelle du muscle est le sarcomère qui est délimité par deux stries Z (flèche). La bande I forme la zone claire, composée d'actine, retrouvée de part et d'autre de la strie Z. Les bandes I, délimitent une zone sombre composée de myosine associée à l'actine, la bande A. Au centre, se trouve la zone H qui traverse verticalement le sarcomère. La strie plus sombre au cœur de la zone H est la strie M. Les cellules musculaires sont très riches en mitochondrie (tête de flèche) et contiennent des citernes à calcium (astérisque).

Le sarcoplasme contient également les organites classiquement retrouvés dans les cellules eucaryotes, les mitochondries y sont particulièrement abondantes. Toutefois, le réticulum endoplasmique, appelé réticulum sarcoplasmique est organisé de façon très particulière : il entoure les myofibrilles (figure 9 B). À interval régulier, il présente des « citernes », renfermant des ions calcium. Ces citernes jouxtent un réseau d'invagination de tubules transverses, les tubules T. Un tubule T et les citernes qui l'entourent, forment une



triade au contact de la membrane sarcoplasmique. Au niveau de ces triades, les membranes des tubules T et du réticulum sarcoplasmique forment des zones de couplage électrophysiologique qui transmet l'influx nerveux à l'intérieur de la cellule et induisent la libération des ions calcium contenus dans les citernes, nécessaires à la contraction des myofibrilles.

## **2. Le tendon :**

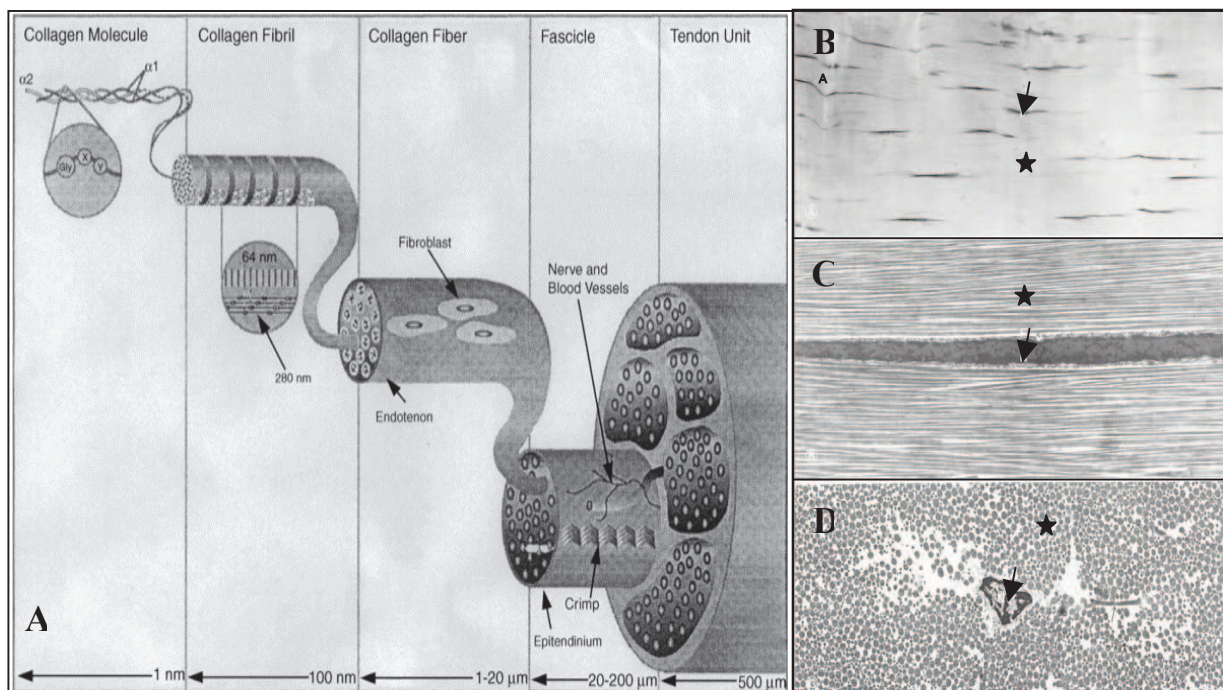
### **2.1. Généralités :**

Les tendons forment de véritables câbles de tissu conjonctif (figure 10 A), reliant le plus souvent le squelette aux muscles mais on peut également trouver des tendons reliant deux muscles (insertions tendineuses) chez les grands animaux, l'exemple le plus commun étant les insertions tendineuses reliant les muscles du flanc du cheval. Ce sont des structures larges et épaisses, très résistantes, permettant non seulement la stabilisation des articulations osseuses mais aussi la transmission au squelette des forces générées par les muscles. Le tendon forme donc avec les os et les muscles une composante dynamique qui permet le mouvement. Il est cependant un acteur passif, c'est-à-dire qu'il est incapable d'induire un mouvement seul. Le ligament possède une structure très proche de celle du tendon et possède la même origine embryonnaire, cependant, les ligaments sont constitués de courtes bandes de tissu conjonctif reliant généralement les os entre eux. Ils ont pour rôle de limiter ou empêcher certains mouvements, ainsi, ils protègent l'intégrité des articulations contre les entorses ou luxations lors de mouvements forcés. Les ligaments ne seront pas discutés dans ce mémoire. La structure des tendons n'est pas homogène, elle diffère suivant la région du tendon et le type de tendon. Histologiquement, le tendon est relié au muscle par la jonction myotendineuse (JMT) et à l'os par la jonction ostéotendineuse (JOT), également appelée enthéses (fibreuse et fibrocartilagineuse).

## 2.2. Organisation des tendons :

Le tendon en lui-même, qui correspond au tissu conjonctif compris entre la JMT et la JOT, est composé de faisceaux de fibres de collagène (figure 10 B) dans lesquels sont positionnées des rangées de fibroblastes tendineux, les ténocytes. Dans certains tendons comme ceux de la queue de rat, ces faisceaux peuvent être subdivisés en faisceaux primaires, secondaires et tertiaires (Kastelic *et al.*, 1978) (figure 10 A). Les faisceaux sont séparés les uns des autres par l'endoténon, un tissu conjonctif lâche d'épaisseur variable qui permet aux fibres de glisser les unes contre les autres. C'est au niveau de l'endoténon que l'on retrouve les vaisseaux sanguins et les nerfs.

Les tendons sont composés de MEC dense. Cette MEC contient 55 à 70% d'eau, ce pourcentage varie en fonction de l'espèce, du genre, du stade de développement, du site anatomique, de l'hydratation et de la condition physiologique du tissu (Elliott, 1965, Vailas *et al.*, 1985). La quantité d'eau présente dans ce tissu joue un rôle important car elle influence



**Figure 10 : Organisation des tendons :** (A) Représentation schématisée de la structure hiérarchisée des tendons, d'après Silver *et al.*, 2003. (B) cliché de microscopie optique de tendon, les fibres de collagène (astérisque) sont unidirectionnelles, parallèles les unes aux autres et les fibroblastes (flèche) sont clairement alignés le long des fibres de collagène. Cliché de MET en coupe longitudinale (C) et transversale (D) d'un tendon. Les fibres de collagène (astérisque), produites par les fibroblastes (flèche), sont orientées de manière unidirectionnelle.

ses propriétés mécaniques et fonctionnelles. Ainsi, des tendons immergés dans une solution hypertonique, donc déshydratés, se déforment moins sous l'effet d'une tension constante que des tendons immergés dans une solution hypotonique (Haut et Haut, 1997). Si la composition en eau du tendon module ses propriétés fonctionnelles, ce sont surtout les composants insolubles du tendon qui contrôlent sa capacité à résister à de très grandes tensions. Cette résistance est assurée principalement par les molécules de collagène qui constituent 60 à 85% de la masse sèche du tendon (Kjaer, 2004). Parmi les collagènes produits par les fibroblastes de tendon, le collagène I est le plus abondant : il représente environ 60% des collagènes présents dans ce tissu. La fibrillogenèse débute par l'association, de façon décalée, de molécules de collagènes. Le collagène I s'associe en microfibrilles, l'ajout bout à bout de collagène I permet la croissance linéaire des microfibrilles qui vont devenir des fibrilles. Les fibrilles s'assemblent latéralement pour former des fibres qui vont elles-mêmes s'associer en faisceaux (Zhang *et al.*, 2005). Cette phase de croissance rapide des fibrilles est corrélée à de grands changements dans la composition de la MEC tendineuse. La présence de collagène III diminue au niveau des faisceaux et augmente dans l'endoténon (Birk et Mayne, 1997). De même, l'expression de la décorine et du collagène XIV diminue (Birk *et al.*, 1995 ; Young *et al.*, 2000). Ces dernières s'associent ensuite parallèlement les unes aux autres, à la manière d'un câble, ce qui confèrent au tendon sa résistance aux tensions. Les fibres de collagène ne sont pas constituées uniquement de collagène I mais également de collagènes fibrillaires quantitativement minoritaires tels que les collagènes III et V qui régulent la fibrillogenèse. L'incorporation de collagène III et/ou V dans les fibres de collagène I conduit à la formation de fibres dites hétérotypiques. Le collagène III représente jusqu'à 10% de la masse sèche des tendons. Son expression varie en fonction des tendons (Riley *et al.*, 1994) et de leur stade de développement. La quantité de collagène III diminue pendant le développement des tendons chez le poulet pour finalement être restreint aux gaines les entourant (Birk et Mayne, 1997). Le collagène III régule l'assemblage initial et le diamètre des fibrilles de collagène I. Ainsi la baisse de l'expression de collagène III est corrélée à une augmentation du diamètre des fibrilles (Birk et Mayne, 1997). Le collagène V régule également le diamètre des fibres en interagissant latéralement avec les fibres de collagène I, comme cela a été démontré dans la cornée (Birk, 2001).

Aux fibres de collagène s'associent également des FACITs comme les collagènes XII et XIV et des protéoglycanes (moins de 0,2% de la masse sèche du tendon) comme la décorine et le lumican qui régulent la formation des fibres et la maturation des tendons (Edom-Vovar et Duprez, 2004). L'expression de *coll1a1*, *col5a1*, *coll2a1* et *coll4a1* est d'ailleurs très fortement induite au moment de la formation du tendon chez la souris (travaux réalisés au laboratoire, non publié). Les FACITs diminuent les interactions entre les fibres de collagène I et par conséquent leur permet de glisser les unes contre les autres lorsqu'une force d'étirement est appliquée (Nishiyama *et al.*, 1994). La distribution des protéoglycanes est fonction du type de stress appliqué sur les diverses régions du tendon. Ainsi les zones soumises à des stress de compression sont plus riches en glycosaminoglycane que les zones soumises à des étirements (Józsa et Kannus, 1997).

Enfin, la MEC des tendons contient d'autres types de collagène (VI par exemple), des composants élastiques (élastine, fibrilline, émiline,...) qui forment des fibres élastiques (en moins grande quantité que dans les ligaments) et d'autres glycoprotéines comme les ténascines -C, -X et dans une moindre mesure -W (Kjaer *et al.*, 2003 ; Tozier et Duprez, 2005 ; Chiquet-Ehrismann et Tucker, 2004).

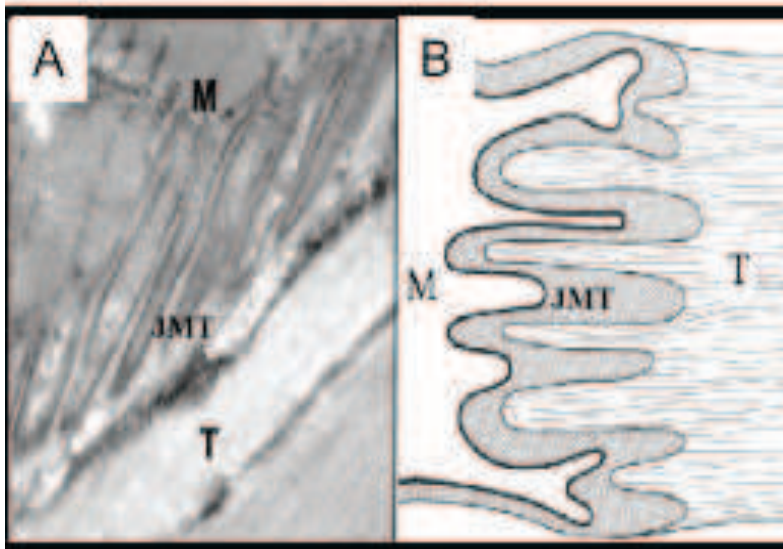
### **3. La jonction myotendineuse :**

La transmission de la force mécanique entre l'intérieur et l'extérieur de la fibre musculaire s'appuie sur un lien structural entre les éléments du cytosquelette des fibres musculaires et les composants MEC. La fibre musculaire possède deux structures remplissant cette fonction, la jonction myotendineuse et les costamères. Ces 2 jonctions présentent des structures d'ancrages similaires, excepté que les costamères possèdent aussi des systèmes dépendants de la spectrine (figure 12) qui ne sont pas présent au niveau de la JMT.

#### **3.1. Structure de la JMT:**

La JMT représente le site d'ancrage spécifique des myofibrilles du muscle squelettique (Clark *et al.*, 2002). Au site de jonction, la membrane musculaire forme des interdigitations (figure 11), pour augmenter la surface de contact entre le muscle et le tendon (10 à 50 fois), ce qui a pour effet d'augmenter la surface sur laquelle s'exercent les forces et

donc de diminuer celles-ci, mais aussi pour créer une accroche physique à la manière de deux pièces de puzzle et pour résister aux forces extrêmement élevées ( $1,8$  à  $3,5 \times 10^4 \text{ N/m}^2$ ) qui s'appliquent en ce point (Tidball et Daniel 1986). De plus, les fins filaments d'actine des myofibrilles s'achèvent en un feuillet dense sous-membranaire où ils s'associent entre eux et au sarcolemme (Tidball, 1991). Le sarcolemme est ici particulièrement riche en complexe DAPC (complexe protéique associé à la dystrophine) et intégrines, notamment  $\alpha\beta1$ .



**Figure 11 : structure de la JMT :** Cliché de MET (A), d'après Grady *et al.*, 2003. Schéma de la structure de la JMT (B), d'après Jòzas et Kannus, 1997. M : muscle, T : tendon.

### 3.2. Les systèmes d'ancrages myotendineux :

La JMT comporte deux types distincts de complexe d'ancrage qui fournissent tous deux un lien structural entre l'actine, cytoplasmique, et la MEC du tendon via la laminine 211. Les filaments d'actine F sont stabilisés entre eux au niveau de la strie Z (jonction entre deux sarcomères) par l'intermédiaire de l' $\alpha$ -actinine. Celle-ci est capable de s'associer à la desmine et à l'actine G qui font le lien entre les deux systèmes d'ancrage : le complexe intégrine  $\alpha\beta1$ -dépendant et le complexe DAPC (figure 13). Les deux systèmes ont en commun la laminine 211.

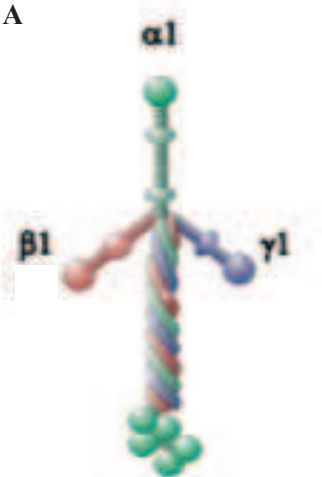
#### 1.2.1 La laminine 211, protéine commune aux deux systèmes :

Le lien entre les protéines membranaires et la MEC du tendon est donc assuré par les laminines. Il s'agit de protéines, et plus précisément des glycoprotéines, trimériques composées d'un bras long correspondant à la chaîne  $\alpha$  et de deux bras courts, les chaînes  $\beta$  et



$\gamma$  (figure 12 A). Ce sont les composants majeurs des lames basales dans lesquelles elles forment des réseaux en forme de mailles en s'associant avec d'autres protéines de la MEC notamment le collagène IV. Il existe à ce jour 5 chaînes  $\alpha$ , 4 chaînes  $\beta$  et 3 chaînes  $\gamma$  formant une quinzaine d'hétérotrimères différents. Une nouvelle nomenclature a récemment été mise en place, ainsi la laminine 1 composée des chaînes  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  et  $\gamma 1$  est maintenant appelée laminine 111. Sur le même principe la laminine 2 ( $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ ) est notée laminine 211 (figure 12 B) (Aumailley *et al.*, 2005).

La chaîne  $\alpha 2$  des laminines, ou mérosine, est exprimée de manière tissu-spécifique par les cellules musculaires et les cellules de Schwann lors de la formation des jonctions neuromusculaires (JNM). La laminine 211 est fortement exprimée à la JMT et elle représente l'unique isoforme de laminine présente à la JMT adulte, les laminines 221 et 411 sont en effet exprimées chez l'embryon (Grounds *et al.*, 2005). La protéine est également enrichie au niveau des synapses neuromusculaires (Zhang *et al.*, 1996). Comme montré pour la laminine 111, la chaîne  $\alpha 2$  serait exportée au niveau du sarcolemme d'où elle régulerait

A	B			
		Standard	New	Previous
		$\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$	111	1
		$\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$	211	2
		$\alpha 1 \beta 2 \gamma 1$	121	3
		$\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$	221	4
		$\alpha 3 A \beta 3 \gamma 2$	332, or 3A32	5, or 5A
		$\alpha 3 B \beta 3 \gamma 2$	3B32	5B
		$\alpha 3 A \beta 1 \gamma 1$	311, or 3A11	6, or 6A
		$\alpha 3 A \beta 2 \gamma 1$	321, or 3A21	7, or 7A
		$\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$	411	8
		$\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$	421	9
		$\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$	511	10
		$\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$	521	11
		$\alpha 2 \beta 1 \gamma 3$	213	12
		$\alpha 4 \beta 2 \gamma 3$	423	14
		$\alpha 5 \beta 2 \gamma 2$	522	—
		$\alpha 5 \beta 2 \gamma 3$	523	15

**Figure 12 : Les laminines** : Structure de la laminine 111 (A) on peut voir les chaînes  $\alpha 1$  (vert),  $\beta 1$  (rouge) et  $\gamma 1$  (bleu). Nouvelle nomenclature des laminines. D'après Aumailley *et al.*, 2005.

l'expression des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  pour former la laminine 211 et s'associer ensuite avec le complexe dystroglycane et les protéoglycane à héparane sulfates par son domaine globulaire C-terminal (De Arcangelis *et al.*, 1996 ; Yurchenco *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 2003). Une



### 3.2.2. Le complexe DAPC :

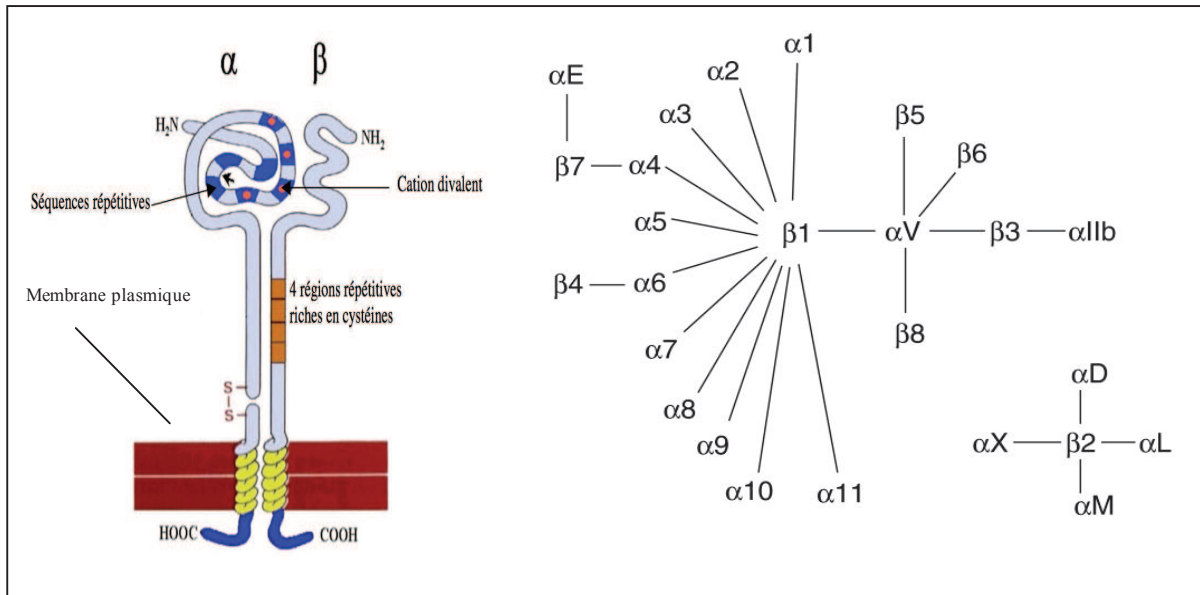
Le composant majeur du complexe membranaire DAPC (Dystrophin/Dystroglycan Protein Complex) est la dystrophine, une protéine de 427 KDa qui se lie à l'actine costamérique. Les autres composants du complexe sont les dystroglycannes  $\alpha$  et  $\beta$ , les sarcoglycanes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ , et  $\epsilon$ , la dystrobrevine et la syntrophine  $\alpha$ . Lorsque le dystroglycanne  $\beta$  (dont la sous-unité  $\beta$  est intracellulaire et la sous unité  $\alpha$  extracellulaire) (Wewer *et al.*, 1996) est glycosylé, il interagit avec la dystrophine en position intracellulaire et le dystroglycanne  $\alpha$  en position extracellulaire. Le dystroglycane  $\alpha$  s'associe à la laminine 211 formant ainsi un lien structural entre l'actine sarcomérique et la MEC. Le domaine extracellulaire  $\alpha$  du dystroglycan se lie aux domaines G C-terminaux du bras long des laminines (Yamada *et al.*, 1996). Les sarcoglycanes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  sont liés entre eux et au dystroglycan  $\alpha$ . Ils sont eux aussi glycosylés et participent à la stabilisation du complexe DAPC au niveau membranaire. Enfin, la dystrobrevine et la syntrophine  $\alpha$  relie la dystrophine aux filaments intermédiaires via la desmoline et la sycoïline. Il est à noter que la syncoïline se lie à l'oxyde nitrique synthétase (NOS) via son domaine PDZ (Post-synaptic Density-95/discs large/Zo-1 C-terminal permettant ainsi la signalisation intracellulaire (Zhang *et al.*, 2003). Le complexe DAPC porte donc la double fonction de lien structural et de signalisation. Notons que la desmine sarcomérique interagit également avec deux autres protéines de ce complexe, la desmoduline et/ou l' $\alpha$ -syncoïline (Clark *et al.*, 2002) (figure 13).

### 3.2.3. Le système d'ancrage dépendant de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ :

Les intégrines sont des récepteurs membranaires, qui ont pour ligands majoritaires les protéines de la MEC. Elles sont présentes sous forme d'hétérodimère qui associent de façon non covalente les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines. Chez les vertébrés, on trouve 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  (figure 14). Les intégrines assurent l'ancrage des cellules sur la MEC et la transduction du signal qui en résultent. L'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  est exprimée au niveau de la JMT, son domaine intracellulaire repose sur un socle protéique qui la relie au cytosquelette de la fibre musculaire. En effet, la desmine est connectée à ce complexe et plus précisément à la plectine par l'intermédiaire d'un adaptateur, l' $\alpha \beta$ -crystalline. L'actine G, quant à elle, peut soit interagir avec la vinculine par l'intermédiaire de l' $\alpha$ -actinine, soit se lier directement à une protéine spécifiquement retrouvée à la JMT, la « Nebulin-Related Actin-



binding Protein » (N-RAP). Celle-ci qui interagit avec l'actine en C-terminal et avec la taline via un domaine LIM en N-terminal (Luo *et al.*, 1999). La vinculine, interagit avec la N-RAP,



**Figure 14 : Les intégrines** : Structure des intégrines (A) et combinaisons des hétérodimères (B). D'après Takada et al, 2007.

est également capable de se lier à la taline. La plectine et la taline sont liées de manière indirecte (la nature de ce lien reste indéterminée) et forment, à elle deux, le socle protéique sur lequel est fixé l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$ . Enfin, la partie extracellulaire de cette intégrine interagit avec l'extrémité C-terminale du bras long de cette laminine. Il a d'ailleurs été montré que les bras courts de cette laminine sont incapables de se fixer sur l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  (Kramer *et al.*, 1991). La fixation de cette laminine sur l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  induit une cascade de phosphorylation via sa sous-unité  $\beta 1$ , impliquant les voies Akt/PkB. En résulte l'activation du couple ILK/PINCH, renforçant le lien structural par recrutement de protéines de la jonction en réponse à l'activation de la voie de signalisation initié par ILK (Wu, 1999).

### III. Développement de l'appareil myotendineux :

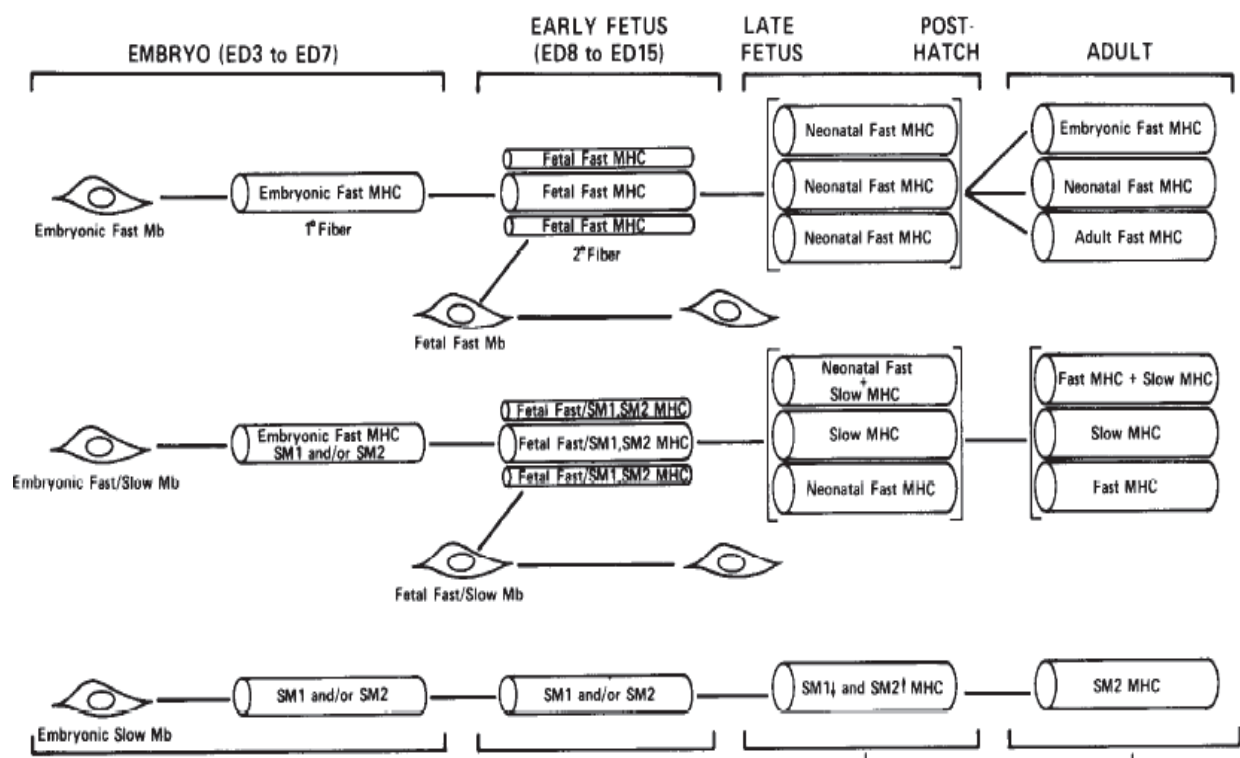
#### 1. Le développement du muscle strié squelettique :

Durant l'embryogénèse, le tissu musculaire se forme à partir du mésoderme qui se régionalise d'une part pour former les somites, d'autre part pour former la notochorde. La partie ventrale des somites, le sclérotome, contribue à la formation du cartilage et des os formant la colonne vertébrale et les côtes. La partie dorsale des somites, le dermomyotome, donne naissance au derme dorsal et aux muscles squelettiques du tronc et des membres. Le myotome à l'origine de la musculature du tronc, est formé par la migration des cellules provenant du dermomyotome (Buckingham *et al.*, 2003). Cette organisation dorso-ventrale du somite (dermomyotome/myotome/sclérotome) est sous l'influence de plusieurs protéines de signalisation impliquées dans les voies de développement comme *Wnt* (Wingless) et *Shh* (Sonic hedgehog). Ces facteurs diffusent progressivement depuis la notochorde, ce qui génère la formation d'un gradient de concentration dans la structure somitique, responsable de la régionalisation des différents compartiments du somite (Tajbakhsh *et al.*, 1998). La myogenèse se déroule alors en deux étapes distinctes :

-*La myogenèse primaire* : Cette étape se caractérise par la formation de fibres musculaires primaires. La fusion de myoblastes embryonnaires génère les myotubes de première génération ou myotubes primaires qui sont à l'origine des fibres lentes (Stockdale et Miller, 1987). Ces fibres de première génération ne représentent qu'une petite partie du muscle adulte. Les cellules précurseurs migrent depuis le somite vers le lieu de différenciation sous l'influence de différents facteurs notamment le facteur de transcription Pax3 (Paired box gene 3). Puis, la détermination et la différenciation des cellules participant à la formation du muscle sont sous l'influence de facteurs de transcription (de type bHLH) spécifiques, les MRFs (Myogenic Regulating Factor), dont quatre membres sont décrits chez le mammifères : Myf5 (Myogenic factor 5), MyoD (Myogenic Differentiation), Myogénine et MRF4 (également appelé Myf6 ou herculine). Myf5 et MyoD sont impliqués dans le processus de myogenèse précoce lors de la détermination et la prolifération des cellules myoblastiques. Ils interviennent également dans la régulation du cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine et l'activation de gènes musculaires précoces, comme les gènes codant pour les chaînes de myosine (figure 15). MRF4 et la myogénine agissent plus en aval dans la différenciation

terminale des myocytes et leur fusion en myotubes. La surexpression de l'un des MRFs dans des cellules non musculaires entraîne l'activation d'un programme de différenciation myogénique alors que les souris invalidées pour les gènes codant pour les MRFs précoces ne forment pas de muscle squelettique (Rudnicki *et al.*, 1993).

- *La myogenèse secondaire* : Au cours de la myogenèse secondaire, la croissance de la masse musculaire est plus importante et l'innervation des muscles commence. L'innervation est indispensable au maintien de la génération primaire et à la mise en place de la génération secondaire. Celle-ci résulte de l'activité des myoblastes fœtaux qui sont présents autour des fibres musculaires primaires innervées. Ces fibres vont se multiplier et fusionner pour donner des fibres secondaires, exprimant des isoformes des chaînes lourdes de myosine différentes de la génération embryonnaire (figure 15). Les myotubes secondaires sont à l'origine des fibres rapides en grande majorité, mais également de fibres lentes dans les muscles uniquement composés de fibres lentes ou mixtes (Stockdale et Miller, 1987).

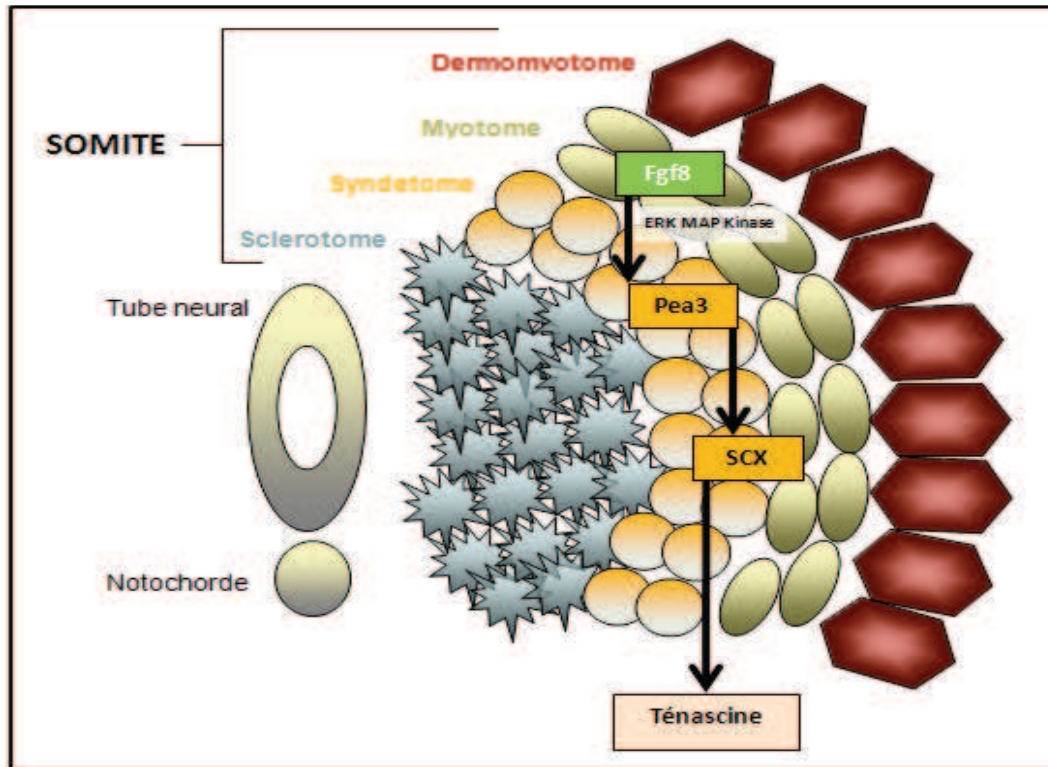


**Figure 15: Modèle de la myogenèse aviaire :** Expression des chaînes lourdes de myosine durant le développement. D'après Stockdale et Miller, 1987.

## 2. Le développement du tendon :

Les mécanismes de contrôle du développement du tendon sont longtemps restés peu connus, notamment à cause d'un problème majeur : l'absence d'un marqueur spécifique du tendon. Des protéines structurales comme la ténascine, les collagènes I et XII, des facteurs nucléaires comme SIX1 et SIX2 (Sine oculis homeobox homolog-1 et -2), EYA1 et EYA2 (Eyes absent homolog-1 et -2), ont été utilisés pour étudier le développement tendineux mais ces protéines sont également exprimées dans d'autres tissus de l'appareil musculo-squelettique chez l'embryon. De même, il existe des variations d'expression de ces mêmes gènes suivant le type de tendon considéré, par exemple EYA1 et SIX2 sont restreints aux tendons fléchisseurs, alors que EYA2 et SIX1 sont spécifiques des tendons extenseurs (Oliver *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 1997). Toutefois, en 2001, un facteur de transcription de type bHLH (basic helix loop helix) a été identifié comme spécifiquement exprimé dans tous les tendons durant leur développement, il s'agit du facteur scleraxis (SCX) (Schweitzer *et al.*, 2001). Ainsi, en comparant les domaines d'expression des gènes *Six1* et *Scx*, il a été observé chez l'embryon de poulet que *Six1* n'était finalement pas exprimé dans le tendon mais plutôt par les cellules myogéniques et surtout dans le mésenchyme postérieur (Bonnin *et al.*, 2005). De plus, SIX1 n'interviendrait pas directement dans la formation du tendon chez les vertébrés. Plus important encore, cette observation a permis d'identifier au niveau du somite, un quatrième compartiment somitique précurseur des tendons du tronc : le syndétome (du grec syndesis signifiant « s'unir ») (Brent *et al.*, 2003). Ce compartiment correspond à une zone particulière, comprise entre le sclérotome (origine du muscle et de l'os) et le myotome (origine du muscle) et contenant une population de cellules exprimant *Scx*. La formation du syndétome est sous le contrôle de facteurs de croissances fibroblastiques, les FGFs, provenant du myotome (Brent et Talbin, 2004) (figure 16).

La découverte du facteur SCX a ouvert la voie à une étude plus fine des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du tendon (Tozier et Duprez, 2005), notamment la voie de signalisation par les FGFs et plus particulièrement FGF8, facteur exprimé dans le myotome (Edom-Vovard *et al.*, 2001 ; Edom-Vovard *et al.*, 2002). Les transcrits des gènes *Fgf8* et *Scx* sont colocalisés dans une région située à l'interface des



**Figure 16 : Les quatre compartiments somitiques :** Illustration schématique des quatre compartiments issus du somite et de la voie de signalisation induite par FGF8 conduisant à l'activation de l'expression de ténascine, protéine exprimée dans le tendon. Modifiée d'après Brent *et al.*, 2003.

muscles et des tendons. Il est à noter que le facteur de différenciation musculaire MyoD est absent de cette zone (Edom-Vovard *et al.*, 2001). Il a été montré que l'expression de *Scx* dans le syndetome est directement régulée par l'activation ou l'inhibition de la voie de signalisation des FGFs. FGF8 activerait, via ses récepteurs FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptor), la voie de signalisation des ERK-MAP kinases, qui a pour cible les facteurs de transcription à domaines ETS, impliqués dans la liaison à l'ADN, comme PEA3 et ERM (Brent et Tabin, 2004). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité kinase des ERK-MAP kinases durant le développement embryonnaire, bloque l'expression de *Scx* (Edom-Vovard *et al.*, 2001). Cependant, et contre toute attente, les souris invalidées pour le gène *Scx* montrent un phénotype de sévérité différente selon le type de tendon. Les tendons soumis aux forces les plus importantes sont les plus affectés, les tendons de maintien et les ligaments ne présentent pas de défaut particulier (Murchison *et al.*, 2007). Cette observation indique qu'il existe certainement un lien entre le facteur SCX et les tensions appliquées sur les tendons durant le processus de maturation des tendons. La MEC des tendons des membres et de la queue est désorganisée avec une atteinte variable du niveau d'expression des marqueurs tendineux

(Edom-Vovard *et al.*, 2001). L'expression de la ténascine C, du collagène XIV et de la ténomoduline n'est pas observée dans les membres antérieurs de la souris *Scx* *-/-* contrairement aux souris sauvages au même stade (Lincoln *et al.*, 2006, Shukunami *et al.*, 2006). Les chondrocytes de souris sauvages expriment également *Scx* et la ténomoduline. L'extinction de *Scx* dans les chondrocytes en culture n'a aucun effet sur l'expression de la ténomoduline, ce qui montre la spécificité de *Scx* dans le développement des tendons (Shukunami *et al.*, 2006).

Un second facteur de transcription, *Mohawk* (*Mkx*), a été récemment identifié comme un acteur de la formation du tendon. Ce gène est exprimé par les cellules des muscles, du tendon et du cartilage. MKX est un répresseur transcriptionnel capable de bloquer la conversion myogénique des fibroblastes induite par apport ectopique de MyoD (en réprimant notamment l'expression de *MyoD*). Il est également capable de recruter d'autres répresseurs comme SIN3A, HDAC1 et SAP18 pour former des complexes co-répresseurs de gènes du lignage myogénique (Anderson *et al.*, 2009). Des souris *Mkx* *-/-* ont été générées. Elle présente une réduction de la masse tendineuse bien que le nombre de ténocytes comptés dans la queue de la souris est inchangé. Ces observations sont accompagnées d'une diminution du diamètre des fibres de collagènes I et d'une répression de l'expression de collagène I, sous entendant que MKX, en plus de son rôle répresseur des facteurs myogéniques pourrait stimuler l'expression du collagène I (Ito *et al.*, 2010). Enfin, deux nouveaux facteurs de transcription, ERG1 et ERG2 (early growth response transcription factors ont été décrits récemment. Ces facteurs de transcriptions, exprimés par les ténoblastes, stimulent la synthèse des collagènes I, III, V, XII et XIV, dans les tendons des membres au cours du développement embryonnaire. Le facteur de croissance FGF4 est nécessaire et suffisant pour induire l'expression des gènes *Erg1* et *Erg2* dans le tendon (Lejard *et al.*, sous presse).

La majeure partie des facteurs de croissance fibroblastiques exprimés durant le développement des tendons modulent l'expression du collagène I et de partenaires protéiques impliqués dans la fibrillogenèse. A l'inverse, d'autres gènes sont activés comme ceux codant pour les protéines structurales, le collagène VI ou la fibromoduline, et pour des protéines régulatrices tels que le TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) ou IGF (Insulin Growth Factor), sont activés (Nurminiskaya and Birk 1998). Si ces régulations ne sont pas encore complètement élucidées, il semblerait que la fibromoduline remplace la décorine pour



stabiliser les fibrilles (et non les microfibrilles) alors que l'expression du TGF $\beta$  et de l'IGF viserait à augmenter la synthèse de collagène I.

D'un point de vue cellulaire, la production de fibres de collagène I est l'événement central de la formation des tendons, ce processus est précédé par l'arrangement des ténoblastes (ténocytes immatures) en colonnes (Benjamin et Ralph, 2000). Les ténoblastes, logés entre les fibres de collagènes, sont des cellules rondes ou étoilées alors que les ténocytes sont des cellules très fusiformes (Kannus, 2000). Les mécanismes contrôlant l'arrangement spatial de ces cellules ne sont pas connus mais on sait, par exemple, que les ténocytes d'une même rangée sont reliés entre eux par des jonctions adhérentes associées aux fibres de stress (Benjamin et Ralph, 2000 ; Kostraminova *et al.*, 2009). Des immunomarquages des connexines 32 et 43 ont également montré que des ténocytes de rangées différentes sont capable de s'associer par l'intermédiaire de jonctions « gap » (McNeilly *et al.*, 1996 ; Kjaer, 2004). Néanmoins, lorsqu'ils sont cultivés dans un gel tridimensionnel de collagène non orienté, ces ténocytes s'assemblent spontanément de la même manière que dans les tendons contrairement aux fibroblastes dermiques ou de cornée dans les mêmes conditions de culture (Doane et Birk, 1991).

### **3. Inter-dépendance muscle – tendon au cours du développement :**

Les expériences d'ablations des muscles ou des tendons chez le poulet ont démontré une inter-dépendance entre le développement du muscle et celui du tendon. Ces manipulations chirurgicales ont également révélé l'existence de mécanismes différents suivant la localisation des tendons.

-*Au niveau du tronc* : Les cellules tendineuses proviennent du syndétome (Brent *et al.*, 2003). De études menées chez la souris et le poulet on montré que la mise en place précoce du myotome dans le somite est nécessaire au développement des progéniteurs du tendon. De plus, l'ablation du dermomyotome, nécessaire à la formation du myotome, abolit l'expression du facteur *Scx*, alors que l'expression du marqueur du sclérotome, *Pax1*, n'est pas affectée (Brent *et al.*, 2003). Ces résultats montrent que les facteurs exprimés dans le myotome sont nécessaires à l'induction de l'expression de *Scx* par le syndétome. Par ailleurs, le myotome est le lieu de synthèse de nombreux FGFs, notamment FGF4 et FGF8 chez le poulet et FGF4 et FGF 6 chez la souris (Tozier et Duprez, 2005). L'activation ou l'inhibition

des différents FGFs induit respectivement la surexpression ou la diminution de l'expression de SCX (Brent *et al.*, 2003 et 2005). Le signal FGF est nécessaire et suffisant pour l'induction de l'expression de *Scx* par activation de la voie des ERK/MAP Kinases (par phosphorylation de ERK 1/2), dont les cibles sont les facteurs de transcription ETS et PEA3 (Brent et Talbin, 2004 ; O'Hagan *et al.*, 1996 ; O'Hagan et Hassell., 1998). En accord avec ces observations, l'utilisation de MPK3, un antagoniste spécifique de la voie des ERK/MAP kinases, inhibe l'expression de *Scx* dans le syndétome (Smith *et al.*, 2005 ; Eblaghie et al., 2003 ; Kawakami *et al.*, 2003).

-*Au niveau des membres* : Les progéniteurs du tendon sont originaires de la plaque latérale alors que les myocytes résultent de la migration, sous l'influence du couple de cytokines SDF-1/CRCX4, des cellules latérales du dermomytome (Chevallier *et al.*, 1977). Les progéniteurs tendineux et musculaires (contrairement à la régionalisation bien définie dans le somite) vont entourer les pré-chondrocytes qui forment un amas cellulaire dense (condensation), pendant les premières étapes de la chondrogenèse (figure 17) (Schramm et Solursh, 1990).

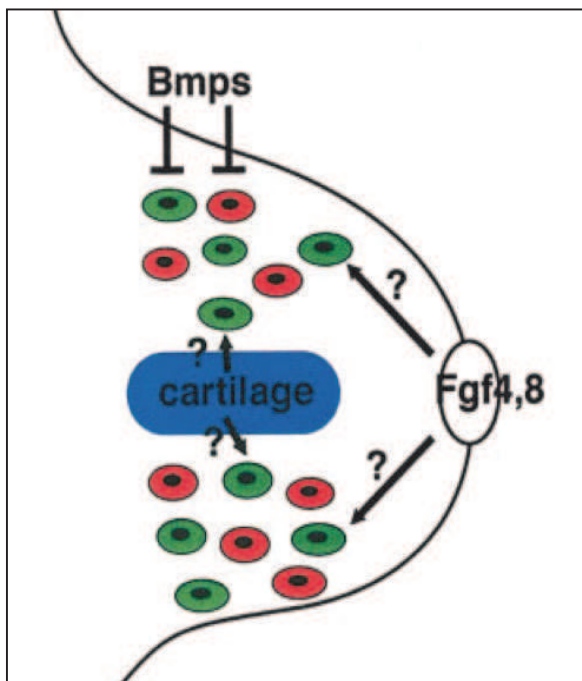
Dans le membre, l'initiation du développement du tendon ne nécessite pas la présence des progéniteurs du muscle. Contrairement à ce qui se passe dans le somite, les marqueurs du tendon sont clairement exprimés dans les membres ayant subi une ablation des muscles. En revanche, l'ablation de l'ectoderme dorsal dans les membres aux étapes précoces du développement abolit l'expression de *Scx*, indiquant que l'ectoderme joue un rôle primordial sur l'expression de ce gène (Schweitzer *et al.*, 2001). Enfin, l'ablation de l'ectoderme provoque une expression anormale des marqueurs myogéniques et une inhibition de la prolifération des myoblastes (Amthor *et al.*, 1998).

Les BMPs (Bone Morphogenic Proteins) sont capables de réguler négativement l'expression de *Scx* et des marqueurs myogéniques dans les membres. Il a également été montré que le TGF $\beta$  était capable d'induire l'expression des marqueurs des progéniteurs tendineux (SCX, collagène I,...). En effet, les souris double mutantes invalidée *Tgfb2*<sup>-/-</sup> ; *Tgfb3*<sup>-/-</sup> et les souris déficientes en récepteur au TGF $\beta$  de type II (T $\beta$ RII), présente une absence de la plupart des tendons (Pryce *et al.*, 2009). Par analogie avec les observations réalisées dans le somite, les FGFs pourraient être responsable de l'induction de *Scx* dans les



membres. Le seul compartiment sécrétant des FGFs présent au moment de l'induction de SCX est la crête ectodermique apicale (Apical Ectodermic Ridges, AER) (Crossley *et al.*, 1996). L'AER produit du FGF8 qui pourrait induire *Scx* directement ou indirectement, par activation d'une cascade de la voie SHH (sonic hedgehog)/FGF4/SCX.

Contrairement aux stades précoces, les stades tardifs du développement du tendon nécessitent la présence des muscles (constitués de myofibrilles à ce stade). En leur absence, les marqueurs du tendon sont anormalement exprimés dans la région distale du tendon (Kieny et Chevallier, 1979 ; Edom-Vovard *et al.*, 2002). Cette phase muscle-dépendante du développement du tendon implique également les FGFs. Le gène *Fgf4* fait d'ailleurs figure de bon candidat si l'on considère la localisation de ses transcrits aux extrémités des fibres musculaires, aux abords de la jonction myotendineuse. De manière très intéressante, un apport ectopique de FGF4 dans des embryons de poulet ayant subi une ablation des muscles, restaure le patron d'expression des marqueurs du tendon dont notamment *Scx* et *TnC* (ténascine-C) (Edom-Vovard *et al.*, 2002).



**Figure 17 : organisation schématique des progéniteurs musculaire, tendineux et cartilagineux au cours du développement des membres chez le poulet (E3.5) :** Les progéniteurs myogéniques (rouge) et tendineux (vert) s'organisent autour du cartilage. Les BMPs (Bone Morphogenesis Proteins) régulent négativement la prolifération des progéniteurs myogéniques et tendineux. D'après Tozier et Duprez, 2005.

De même, les tendons régulent le développement et la morphogénèse du muscle. Il semblerait que ce mécanisme soit plus d'ordre physique que chimique. Les tendons forment une barrière physique qui permet de réguler la longueur des muscles. La taille d'un muscle est dépendante de l'espace libre entre deux tendons (Swasdison et Mayne, 1992). D'un point de vue moléculaire, le facteur FGF8 exprimé par les fibroblastes du tendon pourrait jouer un rôle sur le développement musculaire notamment en modulant l'expression de *Shh* par la notochorde (Edom-Vovard *et al*, 2002, Crossley *et al*, 1996).

Il existe donc une inter-dépendance forte au cours du développement entre les muscles et les tendons, aussi bien dans le tronc que dans les membres. La JMT, située à l'interface de ces deux composants, est donc un compartiment à ne pas négliger dans la compréhension des mécanismes moléculaires spécifiques au développement du système musculo-squelettique.

#### **4. Développement de la JMT :**

Le développement de la JMT reste encore non élucidé aujourd'hui. Comme pour le tendon, la principale raison est l'absence de marqueur spécifique.

Les principales données disponibles ne concernent pas directement le développement de la JMT mais proviennent d'une série d'études qui ont débuté dans les années 90, ne visant pas à analyser la JMT mais ayant pour but d'obtenir des fibres musculaires organisées et contractiles *in vitro* (Swasdison et Mayne, 1991). Ces fibres musculaires ont été obtenues en ensemençant des myoblastes sur un feuillet de collagène I. Cette expérience montre que les myoblastes s'ancrent aux fibres de collagène puis se différencient en myotubes contractiles mais non organisés. Une JMT, comparable à ce qui est observé *in vivo*, est alors produite à l'interface des cellules musculaires et du feuillet de collagène. Il a été montré que comme *in vivo*, la vinculine (Shear et Bloch, 1985), la taline (Tidball *et al.*, 1986) et l' $\alpha$ -actinine (Trotter *et al.*, 1983) sont présentes au niveau des interdigitations de cette JMT. Ce protocole a été optimisé pour obtenir des fibres musculaires orientées et hautement organisées (Swasdison et Mayne, 1992). Deux supports en cire sont placés à chaque extrémité d'un support de culture sur lequel des myoblastes et des

fibroblastes alors sont co-cultivés. Ce montage permet alors la formation d'un muscle contractile organisé, relié à ses extrémités aux supports en cire par l'intermédiaire d'un pseudo-tendon. Comme *in vivo*, il a été détecté dans cette structure la présence de collagène I, de collagène III, de laminines, d'héparanes sulfates et de protéoglycanes. De plus, le marquage de la vinculine montre le recrutement de cette protéine à la JMT, également observé *in vivo*.

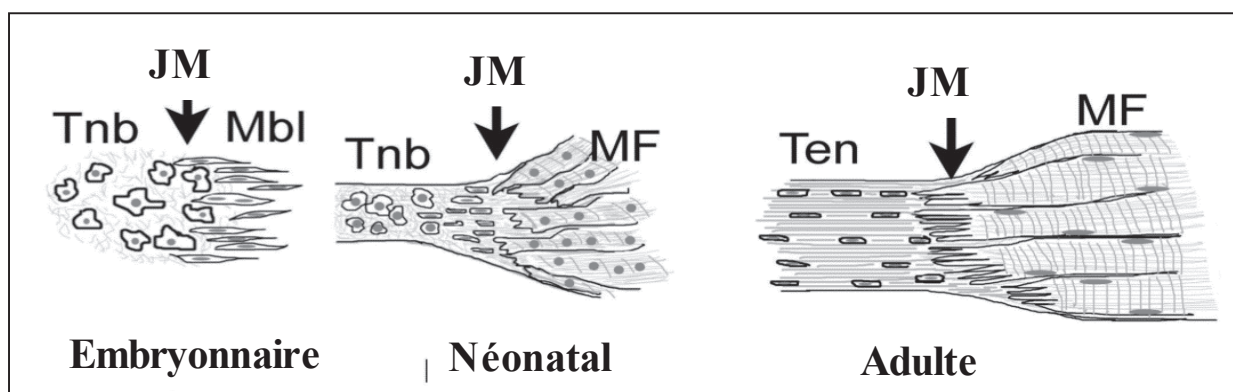
Les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de la JMT restent mystérieux. Toutefois, différentes observations peuvent être rapportées. Nous savons que FGF4 pourrait jouer un rôle important dans la formation du tendon (phase muscle dépendante). Ce facteur est exprimé aux extrémités des fibres musculaires en contact avec le tendon, diffuse dans celui-ci et va stimuler la production de SCX et de ténascine-C par les fibroblastes tendineux. Ces deux facteurs sont indispensables dans le développement et la maturation du tendon (Edom-Vovard *et al.*, 2002). Inversement, FGF8, qui est exprimé par les fibroblastes tendineux pourrait être nécessaire à l'attachement du muscle sur la MEC. Il réprimerait, par extinction de *MyoD*, l'expression de la chaîne lourde de myosine (MHC) aux extrémités des muscles en contact avec le tendon pour permettre la mise en place de la JMT (Edom-Vovard *et al.*, 2001). Ce processus est précédé par l'apparition de vésicules riches en acétylcholinestérase (AChE) aux extrémités des fibres musculaires en contact avec le tendon (Wake, 1976). La quantité de ces vésicules augmente et décroît rapidement. La formation de la JMT paraît induite par libération de l'AChE dans la MEC, à l'interface muscle/tendon.

Une étude récente (Kostrominova *et al.*, 2009) présente les dernières étapes prénatales et les premières étapes néonatales comme des moments charnières dans le développement de l'interface muscle/tendon, en relation avec l'augmentation de l'intensité des forces générées par les contractions musculaires à ces stades. Au cours du développement embryonnaires du tendon, les ténoblastes produisent et s'entourent d'une MEC composée de collagènes I, III et V, de protéoglycanes, d'élastine et de fibronectine. Les ténocytes vont présenter des invaginations profondes de la membrane plasmique, appelées « fibripositors », dans lesquelles sont assemblées et sécrétées les molécules de collagène I (Canty et Kadler, 2005). Ces « fibripositors » vont s'orienter dans l'axe d'application des forces musculaires, orientant ainsi les molécules de collagène I dans le même axe que les forces appliquées (Kostrominova *et al.*, 2009). Les ténocytes sont interconnectés entre eux par des jonctions gap leur

permettant de s'aligner (McNeilly *et al.*, 1996). Dans un processus graduel, les myofibrilles vont également s'orienter de manière plus élaborée, car guidées par la contrainte mécanique générée par la contraction musculaire et orientées par les fibres de collagène du tendon. Il existe donc une inter-dépendance du tendon et du muscle pour synchroniser l'orientation des fibres de collagène et l'axe du vecteur des forces de contractions musculaires (figure 18). De plus, le tendon joue un rôle dans la morphogénèse musculaire. En effet, lors de la myogenèse, des fibres musculaires sont produites en excès et ne parviennent pas à s'ancrer sur le tendon. Ces fibres sont éliminées par apoptose induite par l'acide rétinoïque synthétisé par le muscle, sculptant ainsi les contours du muscle (Rodriguez-Guzman *et al.*, 2007).

L'observation morphologique en MET de l'interface muscle/tendon pendant le développement de l'embryon de poulet a permis de mettre en évidence les différentes étapes de morphogénèse de la JMT (Tidball et Lin, 1989). Aux jours 9 et 10 de développement embryonnaire (E9-E10), les ténoblastes se concentrent à la zone de jonction avec les cellules myogéniques et la protéine p68 s'accumule aux extrémités des fibres de collagène en contact avec le sarcolemme. Cette protéine de type lectine se lie aux laminines dans les phases précoces du développement de la JMT et co-localise avec la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines, mais pas avec la taline qui est cependant le composant majeur des densifications subsarcolemmales (Tidball, 1994). Curieusement, il n'y a pas eu depuis d'études plus approfondies concernant cette protéine. À E11, l'acétylcholine-estérase, puis à E12, la fibronectine visualisée en immunofluorescence, apparaît au niveau de la JMT. À E13, la zone sub-sarcolemmale se densifie, le sarcolemme commence à s'invaginer et les myofibrilles à s'orienter. Les premières fibres de collagène I sont observées. Les invaginations se mettent en place entre E13 et E16 avec le début du recrutement de l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  aux sites d'interactions. Ces invaginations sont absentes chez la souris invalidée pour le gène codant pour la sous-unité  $\alpha 7$  des intégrines, montrant l'importance du recrutement de l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  à la zone de jonction du sarcolemme. Son absence provoque d'ailleurs une fragilisation de la JMT induisant un détachement des cellules musculaires soumises à une contrainte mécanique (Miosge et al, 1999). À partir de E15, les filaments d'actine se stabilisent au niveau des densifications subsarcolemmales. À partir d'E17-E18, de larges fibres de collagène produites par les ténocytes sont observées aux abords de la zone jonctionnelle. La JMT est clairement identifiable à E17 et sa formation se poursuit jusqu'au terme de l'embryogénèse.

Tidball et ses collaborateurs proposent en 1994 un tableau recensant la dynamique d'apparition des différents éléments de la jonction au cours de l'embryogénèse du poulet (tableau 1). Il est intéressant de noter que l'apparition, au cours du développement, des protéines matricielles d'une part et sarcolemmiques d'autre part, est alternée. Nous pouvons donc supposer qu'un facteur matriciel peut permettre le recrutement d'un partenaire cellulaire qui va lui-même induire le recrutement à la membrane d'un autre acteur matriciel, suggérant l'inter-dépendance séquentielle du muscle et du tendon pendant la formation de la JMT.



**Figure 18 : Développement de la JMT :** Développement interdépendant des ténoblastes et myoblastes embryonnaires visant à la formation d'un muscle orienté et organisé se contractant dans l'axe des fibres de collagène du tendon. Tnb : Ténoblastes, Mbl : Myoblastes, MTJ : jonction myotendineuse, MF : Fibres musculaires, Ten : Ténocytes. D'après Kostrominova *et al.*, 2009.

La structure et la composition de la JMT, depuis les premières études très descriptives des années 1980-1990, restent mal documentées et les bases moléculaires du développement de la JMT sont encore obscures. Le manque de marqueur spécifique ainsi que les risques de réaliser, chez les patients, des biopsies dans cette région explique la difficulté d'étudier plus en détail cette interface spécialisée. Son implication dans le développement et le maintien de l'appareil musculo-squelettique est cependant indéniable. C'est également un site primordial dans l'innervation et la vascularisation des muscles et des tendons (Kvist *et al.*, 1995).

Il devient de plus en plus évident que la JMT est l'interface de voies de signalisation impliquées dans le « cross-talk » entre le muscle et le tendon. L'émergence de différents modèles animaux et notamment du poisson zèbre facilite l'étude de cette jonction, qui restait jusqu'alors peu accessible.

Antigens demonstrated at MTJ	Days since fertilization									Posthatch/Adult
	6	8	10	11	12	13	14	15	17	
Collagen I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P68	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laminin	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Integrin $\beta 1$	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vinculin				+	+	+	+	+	+	+
Fibronectin	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Talin	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Integrin $\alpha 7$				-			+			+
Collagen IV	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Basement membrane										→
Subsarcolemmal densities										→
Membrane folding										→

**Tableau 1 : Cinétique d'apparition de différents composants de la JMT durant le développement embryonnaire du poulet :** Les premiers composants sont le collagène I et la protéine P68. A partir de E10, la lame basale se forme avec le recrutement la sous-unité  $\beta 1$  des intégrine, la vinculine et la fibronectine. Les interdigitations musculo-tendineuses se forment à partir de E13 avec le recrutement de la taline, de la sous-unité  $\alpha 7$  des intégrine et du collagène IV. (+) : présence de la protéine, (-) : absence de la protéine, pas de symbole : non testé. D'après Tidball, 1994.

#### IV. Pathologies liées à des atteintes du système musculo-tendineux:

Les pathologies présentées impliquent au moins un acteur de la JMT et ont une répercussion majeure sur l'ensemble du système squelettique. La sévérité de ces pathologies montre le rôle déterminant de la JMT dans le maintien de l'intégrité du muscle. Il existe de nombreuses pathologies musculaires orphelines notamment les arthrogryposes dont les causes moléculaires pourraient impliquer des gènes codant pour des protéines de la JMT, et qui seront à ce titre discutés dans ce chapitre.

Les pathologies musculaires sont multiples, acquises ou héréditaires, d'origine nerveuse ou non,... Nous nous focaliserons ici sur les pathologies musculaires héréditaires sans atteintes du système nerveux central (SNC). Nous distinguerons les « myopathies » des « dystrophies musculaires ».

Le terme « myopathie » désigne une maladie du muscle. Celle-ci peut toucher la fibre musculaire (myopathie congénitale) ou l'ensemble des processus chimiques nécessaires à la fonction du muscle (myopathie métabolique). Les dystrophies musculaires sont par conséquent des formes particulières de myopathies pour lesquelles on observe une

dégénérescence du muscle et la présence de cellules jeunes, témoin de régénération. Ce processus de dégénérescence/régénération tendant à contre-balancer la perte cellulaire est caractéristique des différentes dystrophies musculaires.

## **1. Les dystrophies musculaires congénitales (DMCs) :**

Les DMCs ne présentent pas d'atteinte du SNC et les symptômes apparaissent à la naissance ou durant les premiers mois de la vie. On n'observe donc pas de malformations cérébrales ou oculaires. On note très souvent une composante rétractile (raccourcissement de certains muscles susceptibles de provoquer des déformations articulaires). La forme classique de DMC se manifeste dès la naissance : l'enfant est mou (hypotonie néonatale) et ses membres sont parfois déjà rétractés, réalisant, dans les cas les plus sévères, un tableau clinique d'arthrogrypose que nous détaillerons à la fin de ce chapitre. L'hypotonie musculaire s'aggrave ultérieurement et devient plus apparente avec une atteinte globale, pouvant mettre en jeu le pronostic vital. L'enfant ne parvient généralement pas à se tenir debout et à marcher seul. On distingue dans ce groupe de DMC : le déficit primaire en laminine 211 (mutations sur la chaîne  $\alpha 2$  des laminines), la DMC avec déficit en intégrine  $\alpha 7\beta 1$  et la dystrophie d'Ullrich (mutations sur la chaîne  $\alpha 2$  du collagène VI) et la myopathie Bethlem (mutations sur les chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ou  $\alpha 3$  du collagène VI), bien que le collagène VI ne soit pas un composant de la JMT à proprement parler. Enfin, la myopathie de Duchenne (mutations du gène codant pour la dystrophine) qui peut être classée parmi les pathologies de la JMT car la dystrophine fait partie du complexe DAPC. Toutes ces pathologies sont héréditaires et sont transmises selon un mode autosomique récessif (Leyten *et al.*, 1996).

### **1.1. La dystrophie musculaire congénitale à mérosine (laminine 211) négative MDC1A :**

Découverte en 1991, la MDC1A ou dystrophie de ceinture représente environ 1 naissance sur 50 000. Elle se caractérise par un déficit en chaîne  $\alpha 2$  des laminines, composant de la lame basale des fibres musculaires, qui provoque une faiblesse des muscles de ceinture (abdomen) et une importante hypotonie axiale (Quijano-Roy *et al.*, 2008).

La MDC1A résulte d'une mutation sur le gène *LAMA2*, localisé en 6q22-q23, qui conduit à une absence de laminine 211. Cette laminine, comme nous l'avons vu, permet un



lien structural entre le sarcolemme et la MEC, en interagissant avec l'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  ou avec l' $\alpha$ -dystroglycan du complexe DAPC. Son absence perturbe le développement du muscle et fragilise son attache sur la MEC environnante.

Une forme MDC1B présentant un faible déficit en laminine 211 a été décrite, indiquant une cause moléculaire différente de celle de la MDCA1. Cette pathologie serait liée au dysfonctionnement d'un autre facteur, non identifié, intervenant dans l'assemblage des lames basales, ce qui expliquerait les conséquences sur la réduction de l'expression de la laminine 211. Seules deux familles MDC1B ont été identifiées et il semblerait que le locus 1q42 soit impliqué (Quijano-Roy *et al.*, 2002).

## 1.2. La dystrophie congénitale d'Ullrich et la myopathie de Bethlem :

Le collagène VI est codé par les gènes *COL6A1* à *COL6A6*. La forme la plus commune est l'hétérotrimère formé des chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ . Ces hétérotrimères s'associent en dimères puis en tétramères pour former des filaments « perlés » d'une périodicité de 100 nm (Ricard Blum et Ruggiero, 2005). Ce collagène n'est pas uniquement exprimé à la JMT, il est d'ailleurs présent de façon ubiquitaire dans les tissus. Toutefois, sa promiscuité avec les lames basales des cellules musculaires au niveau de la JMT, sa capacité à interagir avec la chaîne  $\beta 1$  des intégrines (Kuo *et al.*, 1996) ainsi que son implication dans la dystrophie d'Ullrich et la myopathie de Bethlem (qui démontre un rôle tissu spécifique) (Bertini et Pepe, 2002), justifie sa présence dans ce chapitre.

### 1.2.1. La dystrophie congénitale d'Ullrich :

Décrite par Ullrich en 1930, la dystrophie d'Ullrich est due à une mutation du gène *COL6A2*, codant la chaîne  $\alpha 2$  du collagène VI ( $\alpha 2(\text{VI})$ ), localisé en 21q22.3 et/ou 2q37. Des mutations sur le gène codant pour la chaîne  $\alpha 2(\text{VI})$  entraînent un déficit partiel ou total en collagène VI (Jöbsis *et al.*, 1996 ; Camacho-Vanegas *et al.*, 2001). L'absence de collagène VI conduit à une désorganisation de la lame basale et la mort des fibres musculaires par apoptose induite par un dysfonctionnement mitochondrial. Ceci montre que les collagènes peuvent agir de façon indirecte sur des processus intracellulaires majeurs (Irwin *et al.*, 2003).



Ce syndrome se manifeste par une atteinte musculaire sévère. À la naissance, les rétractions et les déformations articulaires sont souvent marquées (torticolis congénial, cyphoscoliose, avec dans les cas les plus sévères un aspect arthrogrypal) et contraste avec l'hyper-extensibilité des membres distaux (Demir *et al.*, 2004). Ces symptômes sont associés à des atteintes de la peau qui est très sèche et présente des protrusions au niveau des follicules pileux. Cette pathologie peut montrer des symptômes communs à ceux du syndrome d'Elhers Danlos classique (Bertini et Pepe, 2002) causé par des mutations sur les gènes *COL5A1* ou *COL5A2* codant pour les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène V (Malfait *et al.*, 2010). Cette observation peut s'expliquer en partie par le fait que le collagène V interagit avec le collagène VI comme montré *in vitro* (Symoens *et al.*, 2010).

#### 1.2.2. La myopathie de Bethlem :

Décrite par Bethlem et Wijngaarden en 1976, la myopathie de Bethlem est due à des mutations sur les gènes *COL6A1*, *COL6A2* ou *COL6A3*. 10 mutations sont décrites à ce jour, 6 touchant le gène *col6a1*, 2 sur *COL6A2* et 2 sur *COL6A3*. Il existe des différences importantes de sévérité résultant de différentes mutations qui provoquent un déficit partiel de collagène VI dans les cas les moins graves, jusqu'à un déficit total dans les cas les plus sévères (Demir *et al.*, 2004).

Les tableaux cliniques sont assez variables mais présentent des caractéristiques communes : une diminution des mouvements fœtaux, des torticolis et luxations congénitales et une hypotonie, des contractures articulaires et une faiblesse des membres dès les premières années post-natales. Les symptômes sont beaucoup moins marqués chez l'adulte (Bertini et Pepe, 2002, Lampe *et al.*, 2005). Des souris *col6a1*<sup>-/-</sup> ont été générées qui phénocopient la myopathie de Bethlem. Elles présentent une perte de contractibilité, une dégénérescence musculaire due à une altération inexplicée du réticulum sarcoplasmique et une apoptose spontanée d'origine mitochondriale. Ces souris ont permis de proposer une piste thérapeutique. En effet, le traitement des souris *col6a1*<sup>-/-</sup> par la cyclosporine-A (CsA), rétablit la morphologie des cellules musculaires et diminue remarquablement, *in vivo*, le nombre de cellules en apoptose (Irwin *et al.*, 2003).

### 1.3. La DMC avec déficit en intégrine $\alpha 7 \beta 1$ :

Les causes moléculaires de cette DMC sont des mutations autosomiques récessives sur le gène *ITGA7* localisé en 12q13 et codant pour la sous-unité  $\alpha 7$  des intégrines. Elle ne concerne que quelques individus dans le monde. Les patients présentent des problèmes de contractibilité et une grande fragilité de la JMT (Hayashi *et al.*, 1998 ; Pegoraro *et al.*, 2002). Des souris déficientes en intégrine  $\alpha 7$  ont été générées (Mayer *et al.*, 1997). L'intégrine  $\alpha 7 \beta 1$  est exprimée essentiellement par les fibres musculaires squelettiques et cardiaques au niveau de la JMT et de la JNM. Elle joue un rôle à la fois structural entre la cellule et la MEC par l'intermédiaire de la laminine 211, et de signal intracellulaire crucial pour le développement du muscle (Song *et al.*, 1993).

## 2. La myopathie de Duchenne :

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou plus communément appelée myopathie de Duchenne est une maladie myodégénérative récessive qui affecte tous les types de cellules musculaires (lisses, cardiaques et squelettiques). C'est une maladie touchant uniquement les garçons car elle résulte d'une mutation sur le gène de la dystrophine (gène DMD), localisé sur le chromosome X. Cette pathologie touche environ un garçon sur 2500. Les femmes porteuses d'une mutation DMD ne présentent aucune gêne, sauf exception, mais peuvent bien entendu transmettre cette mutation à leur descendance.

La dystrophine n'est pas une protéine spécifique de la JMT (protéine subsarcolemique) mais la surface membranaire est tellement augmentée au niveau de la JMT qu'il est observé un enrichissement de la dystrophine à cette interface (Tidball et Law, 1991 ; Law et Tidball, 1993). De plus, elle joue un rôle central dans le lien structural qui relie le cytosquelette d'actine aux composants de la JMT.

La DMD se manifeste rarement avant l'âge de trois ans, il existe parfois un retard dans l'acquisition de la marche. Les chutes se font ensuite plus fréquentes avec des difficultés pour se relever. Au fil des années, il apparaît une faiblesse musculaire progressive des membres et du tronc avec développement de scolioses. Il apparaît plus tardivement des difficultés respiratoires, urinaires, digestives et des atteintes du muscle cardiaque nécessitant

un suivi médical précoce et régulier. Les patients atteints de DMD ne survivent que rarement après une vingtaine d'années.

L'absence de dystrophine provoque une instabilité du complexe DAPC et fragilise ainsi le sarcolemme. Le sarcolemme s'altère lors des contractions musculaires entraînant la dégénérescence des fibres musculaires et une nécrose du tissu musculaire. Cette nécrose s'accompagne d'un processus de régénération qui, dans les premières années de la vie est suffisant pour compenser la dégénérescence. C'est pourquoi les symptômes ne sont pas visibles avant l'âge de deux ou trois ans, âge à partir duquel apparaissent les premières faiblesses musculaires. En effet, cette capacité de régénération diminue avec le temps et devient insuffisante pour une réparation efficace. De plus, l'espace laissé par le tissu lésé est envahi par du tissu conjonctif (fibrose) ou du tissu graisseux. Le muscle perd alors du volume et devient moins puissant (atrophie musculaire) ce qui conduit à une perte de la capacité contractile et un raccourcissement du muscle.

Il existe à ce jour des traitements à base de corticoïdes qui n'ont pas de visée curative mais permettent de soulager les patients. À ce jour, des pistes sérieuses de thérapie sont envisagées notamment par surexpression de l'utrophine, protéine membranaire retrouvée à la jonction neuromusculaire, possédant une structure très proche de celle de la dystrophine. Cette technique a donné des résultats très encourageants chez la souris déficiente en dystrophine : la souris *mdx* (Gillis, 2004). Un autre essai de traitement en double aveugle (contre placebo) de patients de trois à sept ans, utilisant cette fois des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) de l'angiotensine I en angiotensine II, puissant vasoconstricteur, a débuté en mars 2009. Les IEC de l'angiotensine ont fait preuve de leur action bénéfique sur la fonction cardiaque des patients DMD et ont montré, chez la souris *mdx*, leur capacité à maintenir la régénération du muscle squelettique (Fayssoil *et al.*, 2010). D'autres pistes encourageantes sont également explorées comme la thérapie génique directe visant à apporter une mini-dystrophine fonctionnelle codée par un vecteur viral AAV-V (Adeno-Associated Viral Vector). Cette étude est actuellement en test clinique de phase I sur une cohorte de patients de 5 à 12 ans (Liu *et al.*, 2005 ; Lai *et al.*, 2005).

### **3. L'arthrogrypose ou le syndrome d'immobilité fœtale :**

Le terme « arthrogrypose » est dérivé du grec signifiant « articulations en crochet ». Il s'agit d'un syndrome existant dès la naissance, regroupant différentes maladies ayant en commun des raideurs articulaires, soit isolées soit associées à d'autres symptômes viscéraux, nerveux ou intellectuels (Taussig, 2002).

Le terme « arthrogrypose » n'est pas une entité pathologique mais regroupe un nombre impressionnant de syndromes qui ont pour point commun des raideurs articulaires du fœtus. Celles-ci persistent après la naissance induisant une plus ou moins grande limitation des mouvements en rotation ou en flexion. Les premiers symptômes apparaissent au cours du deuxième et troisième mois de la vie embryonnaire. L'origine peut être génétique ou acquise : virus, médicaments,... Toutes les articulations peuvent être touchées ou seulement certaines (membres, thorax, rachis, mâchoires,...). La déformation du pied en varus équin (pied bot) (figure 19 A), le pouce replié dans la paume et les doigts fléchis au niveau de l'articulation inter-phalangienne proximale (figure 19 B) sont des symptômes communément retrouvés chez les patients atteints d'arthrogrypose. La fréquence est estimée à 1 pour 3000 naissances. On peut distinguer deux formes d'arthrogrypose, classique et distale (Filipe, 1998).

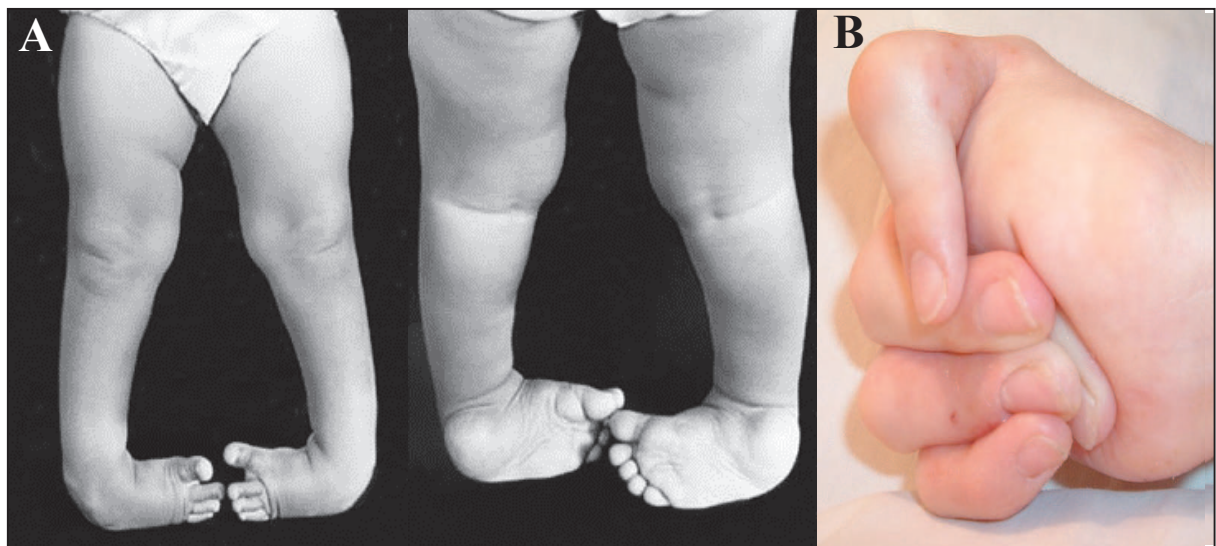
#### **3.1. L'arthrogrypose multiple congénitale (AMC) ou classique :**

Elle est la forme la plus fréquemment rencontrée, de l'ordre d'1 naissance pour 3500. Elle touche les quatre membres dans 45% des cas, uniquement les membres inférieurs dans 45% des cas et seulement les membres supérieurs dans 10% des cas. Les symptômes sont extrêmement variés. À la naissance, il n'est pas rare de rencontrer des fractures favorisées par la raideur articulaire. L'aspect des doigts est important car c'est dans l'observation de leur développement que résidera le diagnostic concernant la fonctionnalité du membre supérieur. L'atteinte du tronc est beaucoup plus rare. La masse musculaire des membres est diminuée ou même totalement absente et est remplacée par du tissu adipeux. Celle du tronc comporte encore des fibres rouges parsemées de fibres blanchâtres ou de graisse. Contrairement aux arthrogryposes distales, l'étude du système nerveux central (SNC) révèle des anomalies dans 90% des cas. Dans d'autres formes dites myopathiques, il n'existe aucune modification du SNC.

### 3.2. Les arthrogryposes distales :

Il s'agit d'une atteinte des mains et des pieds uniquement. Le pouce est également replié dans la paume et les doigts sont déviés du côté cubital. Un pied bot est retrouvé en varus équin ou en talus valgus. Le pronostic fonctionnel des arthrogryposes distales est bien meilleur que celui de la forme classique. Le mode de transmission serait autosomique dominant.

Il existe de très nombreuses autres affections fœtales, des syndromes génétiques ou malformatifs, responsables de raideurs articulaires et classés comme « autres arthrogryposes ». Les atteintes touchent le plus souvent l'encéphale, la moelle épinière et certains viscères. Les facultés intellectuelles sont très souvent affectées et entraînent une perte d'autonomie importante mettant en jeu le pronostic vital. Tous ces cas sont extrêmement rares. Pour citer les plus fréquents : le syndrome de Hecht, le syndrome de Freeman-Sheldon, le syndrome de Moebius et le syndrome de Swartz. On notera également les syndromes de Potter et les syndromes décrits par Pena et Shockey qui sont létaux dès la naissance (Filipe, 1998).



**Figure 19 : Exemples de caractéristiques arthrogrypales :** Exemple de pied bot en varus équin (A) dans le cas d'une arthrogrypose classique. Raideurs articulaires de la main avec le pouce replié dans la paume et les autres doigts repliés sur celui-ci dans le cas d'un syndrome de Freeman-Sheldon (également appelé syndrome du bébé siffleur ou syndrome craniocarpotarsien) (B).

Le diagnostic est basé sur des constatations cliniques et radiologiques à la naissance. Il n'est pas nécessaire de faire d'autres examens complémentaires. Le diagnostic par échographie anténatale est possible : il repose sur la constatation de déformations habituellement rencontrées à la naissance et l'existence d'une immobilité fœtale doit le faire suspecter.

Concernant les traitements, le terme de guérison n'a pas de sens dans les cas d'arthrogrypose. Un traitement permet très souvent d'améliorer les fonctions de déambulation et de préhension, gage de la meilleure autonomie possible.

#### **4. Les autres acteurs dans les dystrophies musculaires :**

En plus des pathologies précédemment explorées, il existe de nombreuses autres dystrophies musculaires induites par des mutations sur les gènes codant pour des protéines de l'appareil musculo-squelettique. C'est le cas des mutations affectant les gènes codant pour les différentes sous-unités ( $\alpha, \beta, \delta, \gamma, \epsilon$ ) du sarcoglycane (*Scga*, *Scgb*, *Scgd*, *Scgg*, *Scge*), ou pour des enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de protéines du complexe DAPC comme l'acetyl-glucosaminyl-transférase-like protéine (*Large*), la protéine O-mannose b-1,2-N-acetyl- glucosaminyl-transférase (*Pomgnt1*) ou encore la protéine O-mannosyl transférase 1 (*Pomt1*) (Steffen *et al.*, 2006). Il a également été démontré que l'absence d'expression du collagène XV dans les souris *coll5a1*<sup>-/-</sup> provoquait une myopathie légère (Erlund *et al.*, 2001). L'atteinte musculaire a été confirmée chez le poisson zèbre par inhibition de la chaîne  $\alpha 1$  du collagène XV par injection de morpholino. Il est montré que l'absence du collagène XV perturbe la diffusion des SHH dans le muscle et conséquemment la maintenance des cellules musculaires lentes et rapides (Pagnon-minot *et al.*, 2008). De plus, un deuxième orthologues existent, *coll5a1b* qui est exprimé par les cellules adaxiales, son rôle n'est pas connu (Bretaud *et al.*, sous presse). Ces observations font du gène *coll5a1* un gène candidat pour une des myopathies humaines orphelines. Toutefois, aucune mutation du gène *COL15A1* humain n'a été décrite à ce jour.

Ces observations prouvent qu'une étude plus approfondie des la JMT est nécessaire pour mieux comprendre les pathologies du muscle. Il est donc crucial de générer

des modèles animaux pour identifier de nouveaux gènes causatifs, caractériser les protéines qui en sont issues et explorer la physiopathologie de ces maladies ou encore proposer des pistes thérapeutiques.

## **V. Le poisson zèbre, un puissant modèle pour l'étude du système musculo-tendineux :**

### **1. Généralités :**

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un poisson téléostéen de la famille des cyprinidés, originaire de l'Inde et de la péninsule Malaise. Le poisson zèbre est introduit à la fin des années 70 par Georges Streisinger comme modèle d'embryologie et de génétique. Depuis les 25-30 dernières années, ce modèle est devenu un outil de choix pour comprendre le développement, la physiologie des vertébrés ainsi que différentes pathologies humaines. Ce poisson présente de nombreux avantages, parmi lesquels, sa petite taille (4-5cm à l'âge adulte), un élevage aisé, un temps de génération court (maturité sexuelle atteinte en 3-4 mois), un développement rapide (tous les organes principaux sont en place en 24h). De plus, les œufs, environ une centaine par femelle, ont un développement *ex utero* (la fécondation est externe) ce qui évite le sacrifice des femelles. Les larves sont transparentes permettant l'observation directe, sur poissons vigiles, du développement des différents organes. Toutes ces caractéristiques rendent les manipulations génétiques et les analyses des phénotypes bien plus faciles que chez d'autres vertébrés. La caractérisation de mutants, les techniques d'imagerie et les nouveaux outils génétiques ont également permis, chez le poisson zèbre, une compréhension plus fine et dynamique des mécanismes précoces du développement et des voies de signalisation conservées (Kimmel *et al.*, 1990 ; 1995 ; Stemple, 2004 ; Guo *et al.*, 2011).

Le programme de séquençage du génome du poisson zèbre est achevé mais pas encore complètement ordonné (Institut Sanger, Grande Bretagne, [www.sanger.ac.uk/project/D\\_rerio/Zv8\\_assembly\\_information.shtml](http://www.sanger.ac.uk/project/D_rerio/Zv8_assembly_information.shtml)). Toutefois, la phase d'assemblage du génome est pratiquement achevée (environ 1500 Mb, réparties sur 25 paires de chromosomes). Le poisson zèbre présente un autre inconvénient majeur puisqu'au cours de l'évolution, 30% du génome a subi une duplication supplémentaire, ce qui en fait un



modèle génétiquement plus éloigné de l'homme que peut l'être la souris. Il reste néanmoins un modèle moins onéreux et beaucoup plus rapide que les autres modèles vertébrés comme la souris.

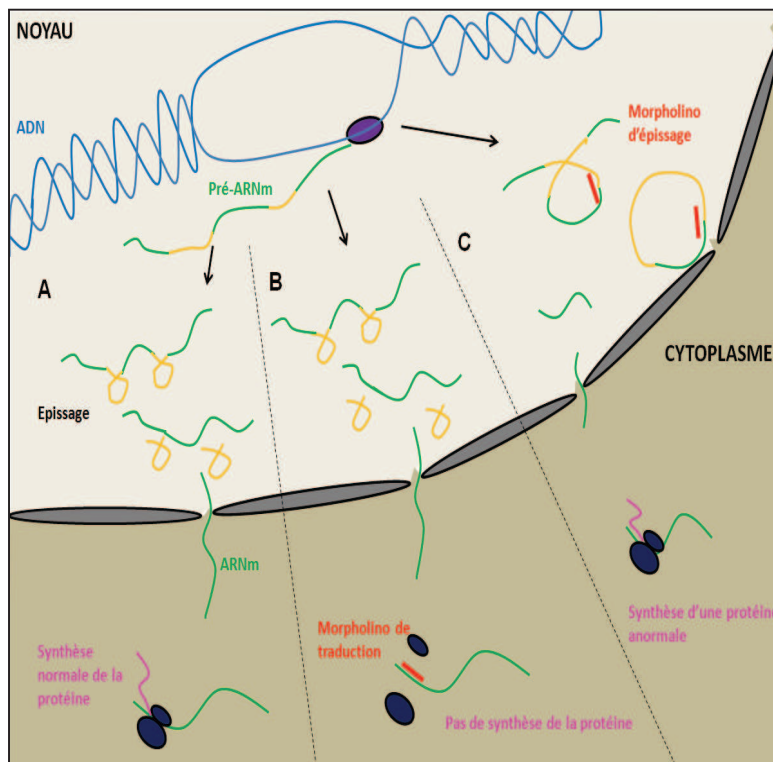
## **2. La stratégie « morpholino » (knock-down) :**

La mutagenèse aléatoire a permis de générer une grande banque de mutants. Cette technique reste longue et fastidieuse et les gènes altérés dans un grand nombre de ces lignées n'ont pas encore été identifiés. L'une des méthodes les plus employées en génétique du développement pour déterminer le rôle d'une protéine est d'invalider le gène codant correspondant dans un chez le poisson zèbre et d'analyser les conséquences phénotypiques provoquées par la perte de fonction. Une autre méthode, très utilisée chez le poisson zèbre, fait appel à la stratégie anti-sens, basée sur l'utilisation des morpholinos (Eisen et Smith., 2008). Les morpholinos sont des séquences synthétiques d'environ 25 nucléotides modifiés dans lesquels un ribose a été remplacé par une morpholine, les rendant insensibles aux ribonucléases (Hudziak *et al.*, 1996). Ils sont dessinés pour s'hybrider spécifiquement sur les séquences stratégiques de traduction des ARNm. Les morpholinos sont injectés dans le vitellus des embryons de poisson zèbre aux stades 1 à 4 cellules (Bill *et al.*, 2009). Cette technique est aujourd'hui utilisable avec deux principes différents : les morpholinos de traduction et d'épissage.

- *Les morpholinos de traduction* : Ils sont dessinés pour être complémentaires du site d'initiation de la traduction. En se fixant spécifiquement sur cette région de l'ARNm du gène d'intérêt, le morpholino empêche le recrutement de la machinerie de traduction. Cet ARNm n'est donc pas traduit, réduisant fortement l'expression de la protéine d'intérêt (figure 20 B).

- *Les morpholinos d'épissage* : Ils ciblent spécifiquement les sites donneurs et accepteurs d'exons. Ils empêchent l'interaction des séquences qui flanquent les introns avec le complexe de petites ribonucléoprotéines (snRNP), l'épissage du pré-ARNm est donc incorrecte et aboutit à la production d'une protéine abérante non fonctionnelle (figure 20 C). Cette stratégie permet également de cibler la délétion d'un domaine en particulier pour étudier son rôle *in vivo*.





**Figure 20 : Mode d'action des différents types de morpholinos :** (A) Epissage physiologique des introns (jaunes) du pré-ARNm aboutissant à la production d'une protéine normale. (B) Les morpholinos de traduction se fixent sur le site d'initiation de la traduction et empêchent le recrutement de la machinerie de traduction. (C) Les morpholinos d'épissages masquent les sites donneur ou accepteur d'exons et provoquent un épissage aberrant aboutissant à la production d'une protéine tronquée.

- *Les morpholinos marginaux* : Cette famille de morpholinos a pour cible les micros ARN et a pour but de décaler le cadre de lecture. L'utilisation de ce type d'oligonucléotides est encore très rare.

- *Les vivo morpholinos* : Cette technique extrêmement récente permet l'action du morpholino à l'âge adulte en modifiant les morpholinos de traduction ou d'épissage avec des dendrimères d'octaguanidinium. Les vivo morpholinos sont injectés en intra-veineux (plus rarement en intra-péritonéal) et diffusent dans les tissus. (Guo *et al.*, 2011).

La méthode des morpholinos knock down présente cependant quelques désavantages. En effet, ces substances présentent une certaine toxicité pouvant engendrer des morphotypes non spécifiques. Il est possible de soustraire la mort cellulaire par co-injection du morpholino p53 avec le morpholino d'intérêt et ainsi d'empêcher l'apparition de zones nécrotiques chez l'embryon (Robu *et al.*, 2007). Pour limiter ces effets indésirables l'expérimentateur injectera toujours la plus faible quantité de morpholino induisant un morphotype. De plus, une fois injecté le morpholino est progressivement consommé au cours du développement et la protéine ciblée sera donc rapidement ré-exprimée lorsque la quantité de morpholino ne sera plus suffisante. La durée d'efficacité d'un morpholino est estimée de 3

à 5 jours. Il est également important de noter que l'inhibition de l'expression d'une protéine par les morpholinos, bien que très efficace, n'est jamais totale (Eisen et Smith, 2008). La spécificité d'un morpholino est validée le plus souvent par injection d'ARNm transcrits *in vitro* codant pour la protéine invalidée. Récemment, le morphotype induit par invalidation de l'expression du perlecan (large protéoglycane à héparane sulfate de la MEC) a été sauvé par l'injection de la protéine entière humaine ou du domaine recombinant correspondant à l'endorépine (Zoeller *et al.*, 2008). L'injection de VEGF a également permis de sauver le morphotype vasculaire du morphant perlecan (Zoeller *et al.*, 2009).

### **3. Le myosepte vertical des poissons, un analogue anatomique du tendon des mammifères:**

Le système musculosquelettique du tronc des poissons est plus simple que celui des tétrapodes. Les muscles s'organisent en une succession de myomères connectés entre eux par de fins feuillets de tissus conjonctifs appelés myoseptes (myo : muscle, septum : séparation). Il existe deux types de myoseptes, le myosepte horizontal et les myoseptes verticaux.

- *Le myosepte horizontal* : Il sépare les myomères dorsaux et ventraux dans l'axe antéro-postérieur. Les composants matriciels seraient synthétisés par les cellules musculaires pionnières qui l'entourent. Cette structure jouerait un rôle dans la transmission des forces générées par les myomères dorsaux et ventraux. Le myosepte horizontal est aussi nécessaire à la structuration en chevron caractéristique des somites (van Eeden *et al.*, 1996 ; Dolez *et al.*, 2011). Son impact sur la nage est cependant beaucoup moins important que celui des myoseptes verticaux. Le myosepte horizontal sert surtout de support de migration à différents types cellulaires pendant le développement embryonnaire. Il est considéré comme un support physique indispensable à la migration des motoneurones rostraux (RoP), médiaux (MiP) et caudaux (CaP) mais aussi à la régulation de leur croissance par certains composants, tels que la ténascine-C. (Schweitzer *et al.*, 2005). C'est un tissu fibreux incomplètement caractérisé. Toutefois, nous avons récemment observé que le collagène XII est fortement exprimé dans cette structure (Bader *et al.*, 2009). Ce myosepte sert aussi de support pour la mise en place de la vascularisation, de la ligne sensorielle latérale et de la pigmentation (Gompel *et al.*, 2001). Le myosepte horizontal peut être absent dans certains cas de dystrophies musculaires induites

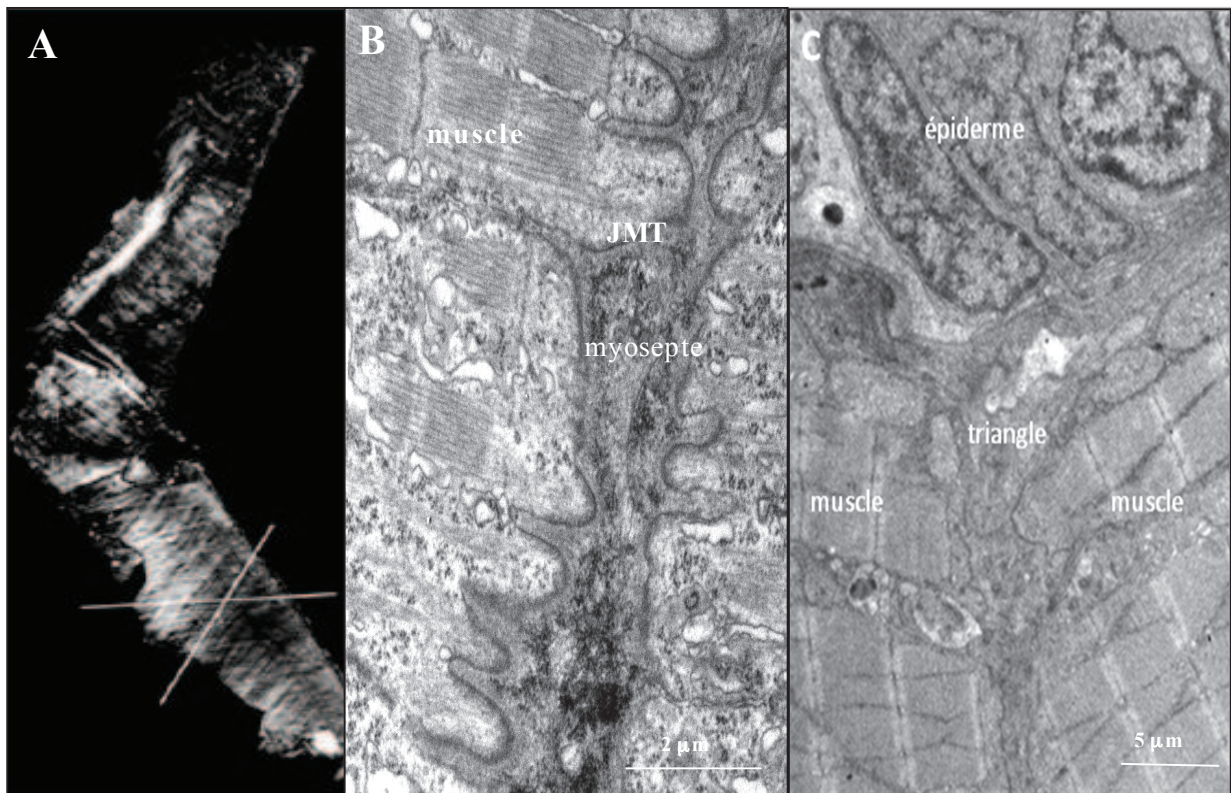
chez le poisson zèbre, c'est le cas du morphant FKRP (Fukutin-related protein) (Kawahara *et al.*, 2010, Thornhill *et al.*, 2008).

- *Le myosepte vertical* : Le myosepte vertical des poissons a pour rôle principal de transmettre les forces musculaires générées par les contractions musculaires. Il adopte une forme caractéristique en V (dite en « V-shape »), toute atteinte du tissu musculaire adjacent lui fait prendre une forme de U (dite en « U-shape »). Il est composé majoritairement de collagène de type I (Morvan-Dubois *et al.*, 2003) et a une épaisseur de 1 à 5  $\mu\text{m}$  chez l'embryon de poisson zèbre à 48hpf (Charvet *et al.*, chapitre résultats). Contrairement aux tendons des tétrapodes où les fibres de collagène sont orientées de manière unidirectionnelle, chez les poissons, les fibres de collagène sont orientées de manière bidirectionnelle, voire tridirectionnellement, ce qui leur confère une propriété de biréfringence (figure 21 A). Cette orientation est adaptée à la locomotion par ondulation (Summers et Koob, 2002). D'un point de vue structural, le myosepte vertical des poissons est extrêmement proche des tendons des mammifères. D'ailleurs, à échelle identique, les forces supportées par les myoseptes sont comparables à celles des tendons des mammifères. Chez les vertébrés supérieurs la matrice tendineuse est synthétisée par les ténocytes et leurs progéniteurs. Chez le poisson zèbre, les corps cellulaires des cellules pouvant être responsables de la production des constituants du myosepte sont logés dans les triangles formés par l'intersection entre les myotomes, l'épiderme et la notochorde (figure 21 C). Leurs prolongements cellulaires s'étendent sur toute la longueur du myosepte vertical. Cette structure est retrouvée chez les Urochordés (calamars), les Céphalochordés (Lancelettes), les poissons et les amphibiens (grenouilles, salamandres) et l'hypothèse selon laquelle le myosepte vertical serait l'ancêtre évolutif du tendon est actuellement explorée (Summers et Koob, 2002, Azizi *et al.*, 2002).

#### **4. Un système musculo-squelettique comparable :**

La musculature du poisson est majoritairement axiale c'est-à-dire de même type que celle du tronc des vertébrés. Le poisson zèbre possède également des systèmes musculaires proches de ceux des membres des mammifères, c'est le cas des nageoires pectorales et des mâchoires. Nous nous intéressons ici uniquement à la musculature axiale.

L'appareil musculo-squelettique axial du poisson zèbre, comme décrit pour les tétrapodes, se forme à partir des somites. Le premier somite apparaît sous l'induction de facteurs sécrétés par la notochorde (facteurs de signalisation Hedgehog notamment), dès 10hpf dans le tronc (Kimmel *et al.*, 1995). Puis, les somites apparaissent les uns après les autres à la vitesse de trois somites par heure pour les six premiers puis un toutes les trente minutes jusqu'à obtenir entre 30 et 34 somites à 24hpf. Ce développement en cascade induit un gradient de maturation somitique selon l'axe antéro-postérieur. On retrouve à ce stade, une



**Figure 21 : Structure du myosepte vertical :** Orientation des fibres de collagène dans un myosepte isolé de *Branchiostoma lanceolatum*, observé sous lumière polarisée. Les bandes lumineuses mettent en évidence l'organisation bidirectionnelle des fibres de collagène. D'après Summers et Koob, 2002 (A). (B,C) Clichés de microscopie électronique à transmission (MET) du myosepte vertical de poisson zèbre 48hpf. (B) Les invaginations de la JMT sont clairement visibles. (C) Cliché de MET d'un triangle myoseptal à 48hpf. (B,C) Clichés du laboratoire.

compartimentation du somite comparable à celle des mammifères comprenant, selon l'axe dorso-ventral, un dermyotome, un myotome et un sclérotome (Stickney *et al.*, 2000). Pour l'heure, il n'a pas été décrit de syndétome chez le poisson zèbre. Le syndétome est défini par une sous population cellulaire exprimant précocement *Scx* et ce facteur n'a que récemment été retrouvé dans le génome du poisson zèbre (Wang *et al.*, 2009). Aucun patron d'expression

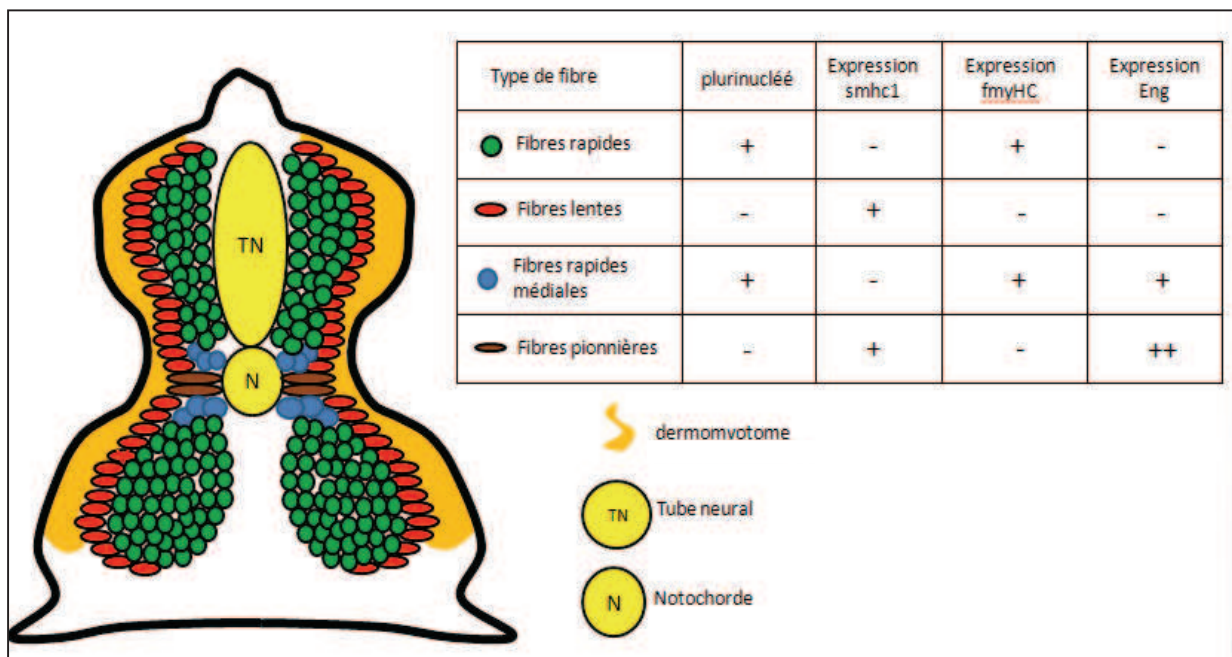


de *Scx* n'a été réalisé chez le poisson zèbre mais l'on peut imaginer une expression de ce facteur dans un compartiment somitique correspondant au syndétome dont pourrait être issu les myoseptes.

Comme pour les mammifères, la myogenèse axiale chez le poisson zèbre est sous la dépendance d'un réseau entrecroisé de voies de signalisation, initiées par des facteurs synthétisés par la notochorde, tels que les acteurs des voies Hedgehog (SHH et EHH, correspondant à indian hedgehog b), et les facteurs WNT/ $\beta$ -cathénine, FGFs, ou encore la voie du TGF $\beta$ . (Ingham et Kim 2005 ; Wolff *et al.*, 2003, Ochi et Westerfields, 2007). Il a été montré récemment que le collagène XV jouerait un rôle primordial dans ce processus en régulant la biodisponibilité de SHH (Pagnon-Minot *et al.*, 2008). La myogenèse dépend de facteurs spatio-temporels où l'orchestration entre localisation cellulaire, présence et quantité de facteurs disponibles et enfin de la capacité des cellules à répondre à ces facteurs, est primordiale.

Comme chez les tétrapodes, le myotome est composé de différentes populations de fibres musculaires, les fibres lentes au métabolisme aérobie adaptés aux efforts faibles et continus et les fibres rapides au métabolisme anaérobie adaptés aux efforts puissants de courte durée (Guyon *et al.*, 2007 ; Stickney *et al.*, 2000). La localisation et l'origine de ces deux types de fibres musculaires sont aujourd'hui bien décrites (Devoto *et al.*, 1996 ; Hirsinger *et al.*, 2004). Les muscles lents proviennent des cellules adaxiales positionnées au plus proche de la notochorde, qui sécrète des facteurs impliqués dans les voies *Hedgehogs* (HHs). Il se crée ainsi, dans le myotome, un gradient de concentration de ces facteurs, les cellules se trouvant aux abords de la notochorde étant soumises aux plus fortes concentrations de facteurs diffusibles (Baresi *et al.*, 2000 ; Blagden *et al.*, 1997 ; Du *et al.*, 1997 ; Wolff *et al.*, 2003). Les muscles lents se différencient en deux types de muscles : les fibres lentes superficielles (SSFs) et les muscles pionniers (MPs) (figure 22). Les SSFs migrent, sous l'influence des voies de signalisation M-, N-cadhérine et SDF1/CXCR4 induites, par l'action des récepteurs membranaires, à la surface latérale du somite (Hollway *et al.*, 2007 ; Cortes *et al.*, 2003) et expriment le facteur de transcription PROX1 (von Hofsten *et al.*, 2008 ; Sanger *et al.*, 2009). Les MPs représentent une sous-population de fibres lentes qui restent en position médiale et expriment fortement les facteurs de transcription Engrailed (ENGs) (Devoto *et al.*, 1996 ; Hatta *et al.*, 1991 ; Ekker *et al.*, 1992). La majeure partie du somite est composée de fibres

musculaires rapides dont les précurseurs expriment le facteur de transcription SIX1 (Henry et Amacher, 2004). Elles ne migrent pas et se différencient de manière tardive (Blagden *et al.*, 1997 ; Wolff *et al.*, 2003). Enfin, les MPs sont entourées d'une sous-population de fibres rapides, les fibres rapides médiales (MMFs), qui expriment de faibles quantités de facteurs ENGs en réponse aux facteurs HHs (Devoto *et al.*, 1996 ; Hatta *et al.*, 1991 ; Ekker *et al.*, 1992, Dolez *et al.*, 2011) (figure 22). La myogenèse terminale des cellules musculaires rapides est induite par les facteurs de transcription myogéniques (MyoD, MyoG, PBX) suite à l'action de facteurs de transcription de type MRFs (Myogenic Regulating Factors) tels que MYF5 (Buckingham *et al.*, 2001, Maves *et al.*, 2007). Groves et collaborateurs ont également mis en évidence une sous-population de fibres rapides, les fibres rapides latérales, pour lesquelles l'initiation et le maintien de l'expression des marqueurs MyoD et Myogenine sont sous la dépendance de FGF8 (Groves et al., 2005). Etonnamment, il n'a pas été rapporté de défaut de myogenèse des fibres rapides chez les mutants *Fgf8*, nommés *Ace*, pour *acerebellar*. Cependant, les fibres rapides latérales ne représentent qu'une faible proportion de cellules et sont difficilement identifiables. De plus, l'absence d'expression du facteur FGF8 peut être compensée par d'autres membres de la famille des FGFs, notamment FGF3 (Reifers *et al.*, 1998).



**Figure 22 : Représentation schématique du myotome de poisson zèbre à 24hpf :** (coupe transversale). Le tableau donne les marqueurs de chaque type de fibres musculaires. Smhc : Slow myosin heavy chain ; fmyHC : fast myosin heavy chain ; Eng : Engrailed.

Les mécanismes impliqués dans la maintenance et la réparation musculaire à l'âge adulte ne sont pas encore élucidés. Les cellules satellites décrites chez les vertébrés supérieurs n'ont, pour l'heure, pas été décrites chez le poisson zèbre. Les facteurs de transcription utilisés comme marqueurs des cellules satellites, PAX7 (humain) ou PAX3 (souris, poulet), n'ont, à ce jour, pas d'homologue fonctionnel chez les poissons. Cependant, des cellules satellites ont été identifiées chez certains poissons comme le saumon de l'atlantique, en utilisant le facteur de croissance C-MET, comme marqueur de ces cellules. Leur nombre pourrait être directement lié à la photopériodicité (Johnston *et al.*, 2000). Ce système pourrait être conservé chez le poisson zèbre (Guyon *et al.*, 2007), la population des cellules satellites diminuant avec la lumière, les conditions d'élevage ne sont pas propices à l'identification de ce type cellulaire.

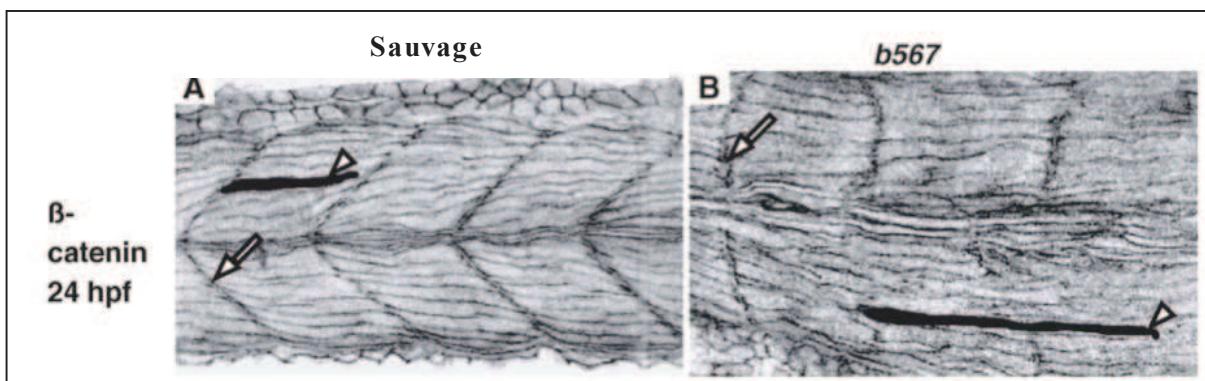
## **5. Interdépendance muscle-tendon dans le développement de la JMT du poisson zèbre :**

Bien que le devenir de chaque compartiment somitique est identique à celui observé chez les tétrapodes, chez le poisson zèbre, les cellules du sclérotome sont largement minoritaires par rapport aux cellules du myotome (Kimmel *et al.* 1995). Le myosepte vertical est issu de la spécialisation des frontières somitiques. Ce processus est induit par la voie de signalisation Notch (Dale *et al.*, 2003, Pourquoié *et al.*, 2003). De nombreux mutants dont l'intégrité des frontières somitiques est affectée (van Eeden *et al.*, 1996) tels que *after eight/deltaD*, *deadly seven/notch1a* (Holley *et al.*, 2000), *mind bomb* (Itoh *et al.*, 2003) et *beamter/deltaC* (Jiang *et al.*, 1996), présentent tous des altérations de différents partenaires de la voie Notch. Le mutant *b567* qui présente également des défauts de frontières somitiques, porte des mutations pour les gènes *her1* et *her7* codant pour des facteurs de transcription cibles de la voie Notch, (Gajewski *et al.*, 2003 ; Henry *et al.*, 2002 ; Holley *et al.*, 2002). Cependant, il existe très probablement d'autres voies impliquées dans le développement du myosepte. En effet, les mutants de la voie *Notch* sont viables avec une segmentation partiellement réalisée indiquant que la voie *Notch* n'est pas la seule voie impliquée dans ce processus (van Eeden *et al.*, 1996).

Lors de la segmentation, les cellules du syndétome vont migrer sous l'épiderme somitique dans des structures formant un triangle entre les myotomes, l'épiderme somitique et



la notochorde (Le Guellec *et al.*, 2004). Comme nous l'avons vu, elles émettent des prolongements cellulaires qui longent les frontières somitiques et produisent les constituants matriciels des myoseptes verticaux. C'est lorsque l'extrémité d'une cellule musculaire entre en contact avec la matrice myoseptale qu'elle commence à exprimer au niveau de la future JMT les composants du complexe DAPC et des points d'adhésion focale (Bassett *et al.*, 2003 ; Crawford *et al.*, 2003, Dubois *et al.*, 2002, Henry *et al.*, 2001 Parson *et al.*, 2002). Le myosepte alors formé va servir de barrière physique délimitant les myotomes au cours de la myogenèse et réguler ainsi la longueur des fibres musculaires (figure 23 A). Ainsi, l'absence de barrière physique myoseptale chez le mutant *b567* provoque la formation de fibres musculaires géantes qui croissent jusqu'à trouver un site d'attachement (figure 23 B) (Henry *et al.*, 2005).



**Figure 23 : Implication du myosepte vertical dans la régulation de la taille des fibres musculaires :** comparaison de la taille d'une fibre musculaire, colorée artificiellement en noir (têtes de flèches), chez le poisson zèbre sauvage et le mutant *b567* (gènes touchés : *her1* et *her7*) à 24hpf. Le contour des cellules est révélé par un immunohistomarquage de la  $\beta$ -caténine. Chez le poisson sauvage la fibre musculaire s'étend sur toute la longueur d'un somite, définie de part et d'autre par les myoseptes verticaux (flèches) (A). La mutation *b567* provoque des interruptions des myoseptes verticaux au travers desquelles les fibres musculaires continuent à croître, aboutissant à la formation de cellules géantes (B). D'après Henry *et al.*, 2005.

L'un des principaux acteurs des interactions cellules/MEC est la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase). Cette protéine intracellulaire est connue pour sa capacité à fixer les filaments d'actine à la membrane plasmique au niveau des points d'adhérence focaux. FAK, en réponse à la fixation des ligands matriciels sur les intégrines, s'autophosphoryle (Gilmore et Romer 1996). La réponse cellulaire induite dépend du niveau de phosphorylation de FAK.

En effet, un haut niveau de phosphorylation induit l'ancrage des cellules à la MEC alors qu'un niveau plus faible déclenche la migration cellulaire (Burridge *et al.*, 1992 ; Yu *et al.*, 1998). Chez la souris *Fak*<sup>-/-</sup>, la gastrulation est initiée mais la notochorde et les somites ne sont pas formés (Furuta *et al.*, 1995 ; Ilic *et al.*, 1995). L'absence de FAK altère le développement de la notochorde et des somites (Kim *et al.*, 2000). De façon intéressante, FAK est enrichie à la JMT chez le Xénope (Baker *et al.*, 1994) et le poisson zèbre (Henry *et al.*, 2001) suggérant que cette kinase pourrait stabiliser la jonction. Cette observation est vérifiée chez le poisson zèbre, chez lequel il a été montré que l'expression du gène *Fak* est altérée chez tous les mutants de la voie *Notch* (*after eight/DeltaD*, *fused somites*, *beatmer* et *deadly seven*). Chez le poisson sauvage le niveau de phosphorylation de FAK au niveau de la JMT est très élevé, ce qui permet l'adhérence et l'ancrage des fibres musculaires sur la matrice myoseptale et la mise en place des interdigitations renforçant la jonction à la manière de pièces de puzzle et en augmentant la surface d'application des forces ce qui a pour effet de diminuer la pression exercée (Henry *et al.*, 2001).

Si les données concernant l'inter-dépendance muscle/tendon pendant le développement embryonnaire des tétrapodes sont relativement nombreuses, ce processus est beaucoup moins documenté chez le poisson zèbre. Cependant, la conservation chez le *Danio rerio* de nombreux de ces acteurs, que nous détaillerons plus tard, laisse clairement penser que le développement de la JMT du poisson est superposable à celui des tétrapodes.

## **6. Le poisson zèbre, un modèle émergent pour les pathologies musculaires :**

La compréhension de la physiopathologie musculaire passe en partie par l'utilisation de modèles animaux. La pathologie musculaire pour laquelle il existe le plus grand nombre de modèles animaux est sans aucun doute la myopathie de Duchenne. Parmi les modèles les plus utilisés on trouve la souris *mdx* qui porte une mutation non-sens de la dystrophine sur l'exon 23. Les souris *mdx* ne phénotypent que partiellement la myopathie de Duchenne, présentant l'inconvénient d'une réparation musculaire largement supérieure à celle de l'Homme (Chapman *et al.*, 1989). Cet inconvénient est en partie contourné par la génération de nouveaux variants obtenus par mutagenèse chimique aléatoire comme la souris *mdx*<sup>5cv</sup> qui présente un phénotype plus sévère que la souris *mdx*. La mutation portée par la

souris *mdx*<sup>5cv</sup> consiste en une mutation du nucléotide en position 1324 de l'exon 10, qui génère un nouveau site d'épissage d'où résulte un codon stop (Im *et al.*, 1996). Il existe également des modèles simiens, canins et félins mais ils ne sont que peu employés pour des raisons évidentes d'éthique. Ce sont cependant d'excellents modèles pour l'évaluation de nouvelles thérapies (Shelton et Engvall, 2005).

Comme nous l'avons déjà vu, le poisson zèbre présente de nombreux avantages. Outre la grande similarité entre les génomes du poisson zèbre et celui de l'humain (Woods *et al.*, 2000), le système musculo-squelettique est remarquablement conservé (Steffens *et al.*, 2007). Sur les 25 gènes impliqués dans 27 dystrophies musculaires humaines décrites à ce jour, 23 sont présents dans le génome du poisson zèbre. Toutefois, 19 de ces gènes présentent une duplication dans le génome du *Danio reiro* et quatre autres gènes associés à des défauts musculaires chez le poisson ne sont pas retrouvés dans le génome humain (annexe II) (Steffens *et al.*, 2007).

De nombreux mutants présentant des défauts de mobilité ont été isolés (Lieschke et Currie 2007 ; Granato *et al.*, 1996). La caractérisation du mutant dystrophine, *sapje* (*sap*), qui présente une dégénérescence des fibres musculaires et leur détachement, comme observé dans la myopathie de Duchenne, a démontré la légitimité du modèle (Bassett *et al.*, 2003 ; Tidball et Law, 1991). Plus récemment, le mutant pour la chaîne  $\alpha 2$  des laminines, *candyfloss* (*caf*), qui présente également un détachement des fibres musculaires sans atteinte de l'intégrité du sarcolemme, a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la dystrophie musculaire congéniale MDC1A (Hall *et al.*, 2007). Les poissons *caf* portent une mutation qui induit un codon stop dans l'exon codant pour le domaine responsable de la fixation du dystroglycan sur la chaîne  $\alpha 2$  des laminines. Contrairement aux mutants *sapje*, les poissons *candyfloss* présentent également une atteinte de la réponse neuromotrice et un défaut de fusion/prolifération des myoblastes (Hall *et al.*, 2007). Très récemment un mutant dystroglycane, *patchytail* (*dag1*), a été généré et se présente comme étant un très bon modèle d'étude des dystroglycanopathies (Gupta *et al.*, 2011).

Aucun mutant pour la sous-unité  $\alpha 7$  des intégrines n'a encore été identifié. Toutefois, les morphants ITGA7 phénocopient les mutants *sapje* et *candyfloss* avec un détachement des fibres musculaires (Postel *et al.*, 2008). Comme nous l'avons décrit,

l'intégrine  $\alpha 7\beta 1$  est connecté au cytosquelette d'actine par le biais de la protéine ILK (Integrin Linked Kinase). ILK se fixe d'une part, sur la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines et d'autre part, elle se lie indirectement à l'actine par l'intermédiaire des protéines du cytosquelette PINCH, paxilline et  $\beta$ -parvine. De manière intéressante le mutant *loc/ilk* (portant une mutation sur le gène *ilk*) et les morphants PINCH et  $\beta$ -parvine phénocopient en partie les mutants *sapje* et *candyfloss* (Postel *et al.*, 2008). Toutefois, le phénotype dystrophique du mutant *loc/ilk* apparaît plus tardivement que chez *candyfloss*. Les auteurs expliquent cette observation par un rôle redondant de l'intégrine  $\alpha 7\beta 1$  et du dystroglycane, tous deux impliqués dans le lien structural entre le cytosquelette des fibres musculaires et la JMT. En effet, l'injection d'un morpholino ciblé sur l'ARNm du dystroglycane chez le mutant *loc/ilk* provoque un phénotype dystrophique beaucoup plus précocement (Postel *et al.*, 2008). De plus, le morphotype dystrophique du morphant ITGA7 se manifeste plus tôt que celui du mutant *loc/ilk* suggérant que la protéine ILK n'est pas nécessaire à la mise en place de la JMT mais jouerait plutôt un rôle dans la stabilisation du lien structural entre cytosquelette et la MEC (Parson *et al.*, 2008). Ces données corroborent les observations faites chez la souris (Gheyara *et al.*, 2007).

Le poisson zèbre s'avère également un bon modèle pour les myopathies d'Ullrich et Bethlem. Une étude récente décrit les orthologues des chaînes humaines de collagène VI (chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) chez le poisson zèbre (Steffen *et al.*, 2007 ; Telfer *et al.*, 2010). L'utilisation de morpholinos d'épissage dirigés contre la chaîne  $\alpha 1$  du collagène VI induit un morphotype dystrophique (Telfer *et al.*, 2010).

Le poisson zèbre est aussi utilisé pour l'étude des myopathies humaines affectant la fonction des canaux calciques. La myopathie multi/minicore (MmD) est due à une mutation du récepteur à la Ryanodine (RYR1) qui joue un rôle majeur dans la libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le muscle. Deux orthologues du gène *ryr* ont été retrouvés chez le poisson zèbre : *ryr1a*, exprimé spécifiquement par les cellules musculaires lentes, et *ryr1b* exprimé spécifiquement par les cellules musculaires rapides. Un mutant *ryr1b*, *relatively relaxed* (*ryr*), a été caractérisé. Ce mutant présente des défauts de relargage d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , conduisant à une perturbation du flux calcique. Cette atteinte se traduit par une faiblesse contractile des fibres rapides, comme observé dans la pathologie humaine (Hirata *et al.*, 2007). Une autre cause

moléculaire de la myopathie MmD est la présence de mutations sur le gène codant pour la sélénoprotéine (*sepn-1*) dont la fonction reste obscure (Ferreiro *et al.*, 2002). Les fonctions de RYR1A et SENP-1 ont été analysées par injection de morpholinos chez l'embryon de poisson zèbre. Le morphant SENP1 présente un phénotype similaire au morphant RYR1A et dans les deux cas le phénotype ne touche que les fibres lentes. De plus, il a été montré par co-immunoprécipitation à partir d'extraits d'embryons sauvages que RYR1A interagit avec SENP1 (Jurynek *et al.*, 2008).

L'ensemble des données de la littérature démontre la fiabilité du modèle poisson zèbre pour comprendre la physiopathologie des maladies musculaires.

Le *Danio* est aujourd'hui utilisé pour l'évaluation de thérapie visant à lutter contre les dystrophies musculaires, notamment pour le criblage de drogues. Cette technique est beaucoup moins onéreuse chez le poisson zèbre que chez les autres modèles de vertébrés. En effet, l'utilisation du poisson zèbre permet de simplifier les protocoles car les embryons et les larves peuvent être élevés en plaques 96 puits, la drogue étant directement ajoutée au milieu d'élevage (den Hertog *et al.*, 2005). Ainsi, des molécules sauvant le phénotype des mutants *gridlock* (*grl*, gène *hey2*) et du mutant *crash and burn* (*crb*, gène *bmyb*) (Peterson *et al.*, 2004 ; Stern *et al.*, 2005) ont été identifiées. Une autre approche consiste à tester et évaluer une thérapie génique chez le poisson zèbre. La thérapie génique peut avoir un mode d'action direct, visant à réparer le gène muté, ou indirecte c'est-à-dire à traiter les symptômes induits par la mutation. Des essais de thérapie directe ayant pour but d'apporter, en utilisant un vecteur viral, un gène codant pour une mini-dystrophine chez le mutant *sapje* devraient être réalisés prochainement (Guyon *et al.*, 2007). Des essais en thérapies indirectes visant à surexprimer l'intégrine  $\alpha 7\beta 1$ , la transférase GalNAc (enzyme qui intervient dans l'ajout des glycosaminoglycanes sur les composants du DAPC), NOS (Nitric Oxyde Synthase, composant du DAPC), ADAM 12 ou encore la calpastatine chez des morphants dystroglycane ont donné des résultats encourageants (Engvall et Wewer 2003). Pour affiner les analyses, il est possible de travailler sur des fibres musculaires isolées comme cela a déjà été réalisé chez le mutant *fub-1* (*fibrils unbundled*) dont le gène impliqué n'est pas encore caractérisé mais qui présente une absence de myofibrillogénèse (Felsenfeld *et al.*, 1990 ; 1991). La transplantation de cellules musculaires saines chez des poissons mutants est également envisageable (Henry *et al.*, 2005).

# Matériels et Méthodes

## I. Modèle Biologique : Poisson zèbre (*Danio rerio*)

### 1. Les lignées sauvages :

Les poissons zèbres *Danio rerio* de la souche AB/Tübingen (AB/Tu) proviennent de l'élevage commun du PRECI (Plateau de Recherche Expérimentale de Criblage *In vivo* ; numéro d'agrément : 693870602). Ils sont élevés en cellule climatique à 28°C et en photopériode de 13h30 de jour et de 10h30 de nuit, dans une eau osmosée de conductance 175 µS/cm. Le pH de l'eau est compris entre 7 et 7,4. L'eau est filtrée par deux filtres à particules, un filtre à carbone pour éliminer le chlore et un filtre bactériologique afin d'éliminer toutes traces de nitrites. Avant d'être redistribuée dans les bacs, l'eau est stérilisée aux UV. L'ensemble de ce processus est réalisé en circuit fermé.

### 2. Les lignées mutantes :

Durant cette étude, le mutant nul dystrophine (*Sapje* ; *sap*<sup>a222t</sup>*dmd*), portant une substitution du nucléotide en position 222 de A en T (Basset *et al.*, 2003), a été utilisé. La mutation est portée par l'exon 3 du gène de la dystrophine (*dmd*). Les embryons *sap*<sup>-/-</sup> sont obtenus par croisement de poissons hétérozygotes *sap*<sup>+/-</sup>. En effet, la mutation est conservée sous forme hétérozygote (absence de phénotype) car la mutation homozygote est létale. Les adultes sont génotypés par PCR. Un échantillon de nageoire caudale est prélevé sur le poisson anesthésié (technique du « fin-clip ») dans une solution de tricaine 1g/L (Sigma) puis l'ADN génomique est extrait par passage à 95°C dans une solution de NaOH 50 mM (Fulka) (Meeker *et al.*, 2007). Les exons 3 et 4 sont amplifiés avec les amorces suivantes sens 5'-AAAC AGCCAGCTGAACCAAT-3' et anti-sens 5'-CTTCTGGAGGTTCTGGTTGG-3' puis séquencés (GATC, Lyon).

Il a également été utilisé le mutant *Fgf8* (*Ace* ; *ace*<sup>g282a</sup>) portant une substitution de G en A altérant de site donneur d'épissage porté par l'exon 2. Cette altération induit la production d'une protéine tronquée ne comportant que l'exon 1 associé à quelques acides aminés aberrants résultant du décalage du cadre de lecture (Reifers *et al.*, 1998). Les



embryons mutants de 48 hpf, fixés en méthanol, on été fournis par « the center for development and biomedical genetic, university of Sheffield, UK ».

### **3. Elevage des embryons :**

Les embryons obtenus par croisement naturel des différentes souches sont placés dans des boîtes de Pétri de 90 mm contenant du milieu E3 (solution 30X : 58 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM Hepes pH 7,4) auquel sont ajoutés 60 mg/L de bleu de méthylène. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 28°C. Le milieu est renouvelé et les embryons morts sont retirés de façon journalière. Les différents stades de développement sont identifiés selon Kimmel et sont décrits dans l'annexe 1 (Kimmel *et al.*, 1995).

## **II. Techniques de biologie cellulaire et développement:**

### **1. Stratégie Knock-Down par injection de morpholino :**

#### **1.1. Détermination des morpholinos :**

Des oligonucléotides antisens, appelés morpholinos, ont été dessinés et synthétisés par Gene Tools (USA, Philomath, Oregon). Les morpholinos ont une longueur de 20-25 mers et un pourcentage GC d'environ 50%. Deux morpholinos décalés sur le site d'initiation de la traduction du collagène XXII sont dessinés (MO22a et MO22b) ainsi qu'un morpholino contrôle « mismatch », possédant cinq mutations sur la séquence du MO22a. Les morpholinos sont repris dans de l'eau stérile contenant du rouge de phénol 1/20 afin de visualiser le point d'injection et la diffusion des morpholinos. Les morpholinos sont injectés dans des embryons de poisson zèbre au stade 1 à 4 cellules, à raison de 8.5ng par embryons, quantité minimale induisant un morphotype dans ces expériences.

MO22a: 5'-CTTGAGCCCAAATCGAAACTCCATC-3'

MO22ms: 5'-CTT**C**AG**G**CCCAAAT**G**GAAA**A**TC**A**ATC-3'

MO22b: 5'-CATGAAGTTGCTGCTCCTGTGGAGA-3'

Une étude fonctionnelle préliminaire du collagène XII a également été réalisée. Les morpholinos MO12a et MO12b ont été injectés à 13ng par embryons dans les mêmes conditions que décrites précédemment.

MO12a : 5'-ATGCCTGACCGACATCTTCACCCC-3'

MO12b : 5'-GTATCAGCAGAACATCAATCAAAT-3'

### 1.2. Préparation des capillaires et microinjection des embryons :

Les capillaires d'injection utilisés sont fabriqués à l'aide d'une étireuse P2000 équipée d'un filament laser dans les conditions suivantes (programme 31, unités arbitraires): Heat : 470, Pull : 120, Vel : 80, Del : 80.

La veille de l'injection, 5 à 8 couples sont placés dans des bacs de ponte. L'allumage automatique des lumières le matin déclenche des pontes synchronisées. Les œufs fertilisés, non déchorionnés, sont récupérés et placés dans des boîtes de Pétri 90 mm recouvertes d'agar 2,5% à la surface duquel sont moulées 5 rigoles à l'aide de capillaires non étirés (diamètre d'environ 1mm). Les œufs sont placés dans les rigoles dans du milieu E3 (red sea salt, Tetra, 0,6g/L ; bleu de méthylène 0,1%). Les embryons sont injectés avec 8.5ng (quantité la plus faible donnant un morphotype, différentes concentration ont été testées sur 200 embryons chacune) de MO22a, MO22b ou MO22ms, ou 13ng pour les MO12a et MO12b.

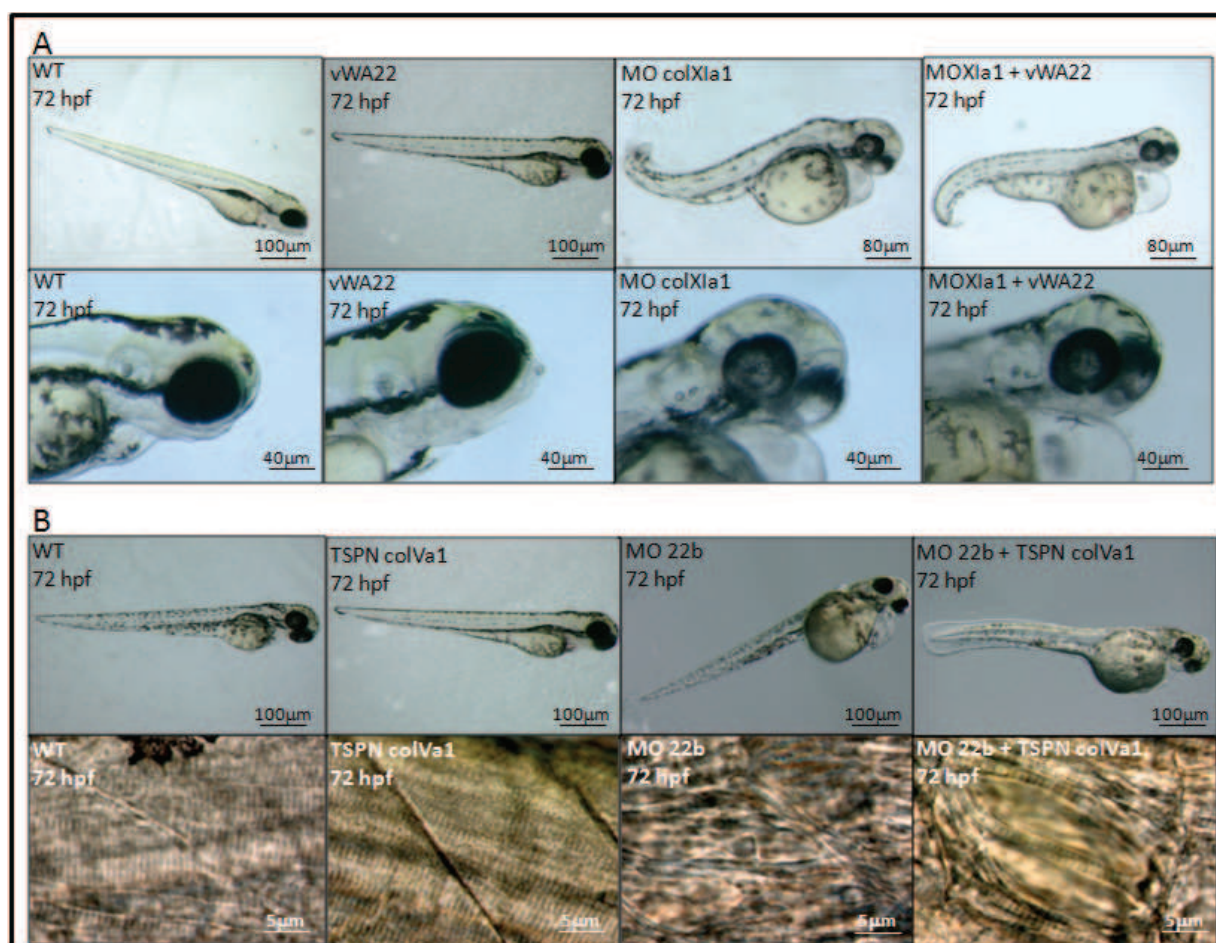
### 1.3. Sauvetage du morphotype :

Les embryons sont co-injectés avec 8,5ng de MO22 et 0.2 à 0.32 ng de protéine recombinante comme décrit précédemment (Zoeller *et al.*, 2008 ; 2009). Les protéines recombinantes, produites et purifiées par le laboratoire de Manuel Koch (Cologne, Allemagne) correspondent aux domaines vWA22 de poisson zèbre et à la protéine entière

humaine Col22. Un contrôle de leur pureté est préalablement réalisé sur SDS-PAGE (voir paragraphe 5.3). Ont été également injectés des domaines recombinants du collagène XXII humain correspondant à des sites potentiels de fixation aux intégrines (Integrin Binding Site, IBS) à raison de 0,15 ng par embryon. Les quantités respectives de protéine à co-injectées ont été déterminées après injection d'une gamme de dilution. La quantité respective de protéine utilisée pour être co-injecter avec le morpholino correspond à la dernière dilution n'induisant pas de défauts morphologique (toxicité) (Figure 24). La microinjection de protéine pour le sauvetage du phénotype étant encore une technique très peu utilisée (Zoeller *et al.*, 2008 ; 2009), plusieurs contrôles, en plus des contrôles de routine, ont été réalisés. Ainsi il a été vérifié que la protéine d'intérêt injectée n'interférait pas directement avec le morpholino, le rendant ainsi inefficace. Pour cela la protéine d'intérêt est co-injectée avec un autre morpholino (MO col11a1 1 mM (Baas *et al.*, 2009) (Figure 24 A) et le morpholino MO22b est co-injecté avec le domaine recombinant TSPN du collagène V à 0,32 ng (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007) (Figure 24 B). Les résultats montrent que seul le domaine vWA22 de poisson zèbre et la protéine entière hFL<sub>XXII</sub> sont capables de restaurer le morphotype MO22.

## 2. Coloration au bleu Alcian :

Les embryons sont fixés à différents stades de développement dans du paraformaldéhyde à 4% tamponné au PBS pH 7,4, pendant 24h à 4°C. Après lavage au PBS pH 7,4, les embryons sont incubés dans un mélange acide-alcool (0,37% HCl et 70% éthanol) puis colorés à température ambiante avec 0,1% de bleu Alcian (Sigma) dans un mélange volume à volume éthanol – acide acétique 25%. La décoloration est effectuée par plusieurs lavages en acide-alcool (0,37% HCl et 70% éthanol) puis par un bain d'éthanol 70% de plusieurs heures pour diminuer le bruit de fond. Les embryons âgés de plus de 48 h sont dépigmentés par un passage de 10 à 15 min dans une solution 1% KOH, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du PBS pH 7,4. Les embryons sont ensuite rincés en PBS et les tissus non cartilagineux sont éliminés par incubation des embryons dans de la Javel 1/10 pendant 5 à 10 min. Les échantillons sont observés sous une loupe Leica MZ16 reliée à une caméra couleur Nikon DMX1200 ou observés au microscope (Leica MacroFluo). Cette coloration permet de visualiser spécifiquement les pièces cartilagineuses des larves.



**Figure 24 : Contrôles des expériences de sauvetage du morphotype par injection de protéines.** (A) L'injection du domaine recombinant vWA22 de poisson zèbre à 0,32 ng n'induit pas de toxicité. Le morpholino MO col Xla1 provoque majoritairement un défaut de développement du cartilage comme montré précédemment (Baas *et al.*, 2009). La co-injection du MO col Xla1 et du domaine vWA22 de poisson zèbre ne sauve pas le morphotype « cartilage » montrant que la protéine recombinante utilisée n'interfère pas avec l'action des morpholinos. (B) L'injection du domaine recombinant TSPN du colV humain (taille proche de celle du domaine vWA22 de poisson zèbre) à 0,32 ng n'a aucun effet. L'injection du MO22b induit un morphotype dystrophique qui sera largement décrit dans la partie « résultats ». La co-injection du MO22b et du domaine TSPN colV humain ne sauve pas le morphotype induit par le MO22b. Cela montre que l'action du morpholino n'est pas affectée par la co-injection d'une protéine spécifique.

### 3. Étude de la mort cellulaire :

L'acridine orange (Sigma) est un colorant vital qui pénètre spécifiquement dans les cellules en apoptose/nécrose et permet ainsi de visualiser la mort cellulaire. Toutes les étapes se déroulent dans l'obscurité et à température ambiante. Les poissons vivants ou fixés sont incubés 30min dans une solution d'acridine orange à 2 µg/mL diluée dans du E3. Les poissons sont ensuite lavés 5 fois 5 min dans du E3 avant d'être observés avec un microscope inversé à fluorescence (Nikon TE300) pour les poissons vivants ou montés entre lame (sur les extrémités de laquelle seront collés deux lamelles pour ne pas écraser les embryons) et lamelle et observés avec un microscope à épifluorescence droit (Nikon Axioplan 2) ou confocal (Leica SP5) pour les embryons fixés.

### 4. Exposition des larves à la drogue SU5402 :

La drogue SU5402 (Calbiochem) est un inhibiteur de la voie de signalisation FGF. La poudre est dissoute dans du DMSO (Sigma) pour obtenir une solution mère à 1mM d'inhibiteur. Les embryons sont placés en plaque 12 puits contenant 2 mL de E3 à raison de 10 embryons par puits. Les embryons sont exposés au SU5402 par addition de solution mère dans le E3 de façon à obtenir 25 µM final. Les différents lots d'embryons sont respectivement exposés au SU5402 à partir de 22 hpf pendant 6 h, 8 h et 26 h. Le SU5402 étant photosensible, toutes les étapes sont réalisées dans l'obscurité. Les embryons contrôles sont placés dans le tampon de dilution seul (DMSO à 1/400 final dans E3). Après exposition, les embryons sont fixés au paraformaldéhyde 4%.

### 5. Étude de l'expression des gènes par hybridation *in-situ* :

#### 5.1. Marquage des sondes à la digoxigénine-11-UTP:

Les différentes sondes oligonucléotidiques sont réalisées à partir de plasmides dans lesquels ont été clonées les séquences d'intérêts. Les plasmides sont linéarisés par des

enzymes de restriction (Promega) adaptées (1U d'enzyme/ $\mu$ g d'ADN) (Tableau 2) et sont utilisés comme matrice de transcription pour synthétiser les sondes sens, qui serviront de témoin négatif, et les sondes antisens nécessaires pour réaliser les hybridations *in situ* après une précipitation/purification de ces sondes au phénol-chloroforme/acétate de sodium.

Nom des sondes	souche	plasmide	sonde sens	sonde antisens
sondes dirigées contre les sous domaines N-terminaux du collagènes XXII				
TSPN	DH5- $\alpha$	pGEMT-easy	Sac II / SP6	Spe I / T7
vWA	DH5- $\alpha$	pGEMT-easy	Sac II / SP6	Spe I / T7
sondes utilisée dans l'étude des acteurs de la JMT				
SCX	TOP-10	pCR4®-TOPO®	Not I / T3	Spe I / T7
FGF8	DH5- $\alpha$	pBS-SK+	non réalisée	EcoRI / T7
FGF4	TOP-10	pCRII®-TOPO®	Not I / SP6	Bam HI / T7

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes sondes utilisées :** Les enzymes de restrictions et les transcriptases utilisées pour fabriquer les sondes sens et antisens y sont reportées. La sonde antisens Fgf8 ayant été testée plusieurs fois par différents laboratoires et donnant les résultats précédemment décrits, la sonde sens n'a pas été synthétisée.

Le milieu réactionnel de transcription 1X (10X : Tris-HCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 60 mM, DTT 100 mM, spermidine 20 mM, pH 8) spécifique des ARN polymérases T3 ou T7 est ajouté à 20 U de T3 ou T7 ARN polymérase. Au mélange NTP-DIG-RNA (ATP 10 mM, CTP 10 mM, GTP 10 mM et TTP 10 mM, pH 7,5 ; Roche) sont également ajoutés 35 U d'inhibiteur de RNases (Promega) et 1  $\mu$ g d'ADN linéarisé dans un volume final de 20  $\mu$ L. L'ensemble est incubé pendant 2 h à 37°C. L'ADN ayant servi de matrice est ensuite digéré par 2 U de DNase I sans RNase pendant 15 à 37°C.

## 5.2. Fixation des embryons :

Après avoir déchorionné, lorsque nécessaire, les embryons avec une paire de pinces, les poissons sont anesthésiés avec 0,64 mM de tricaine (Sigma) dilué dans le milieu



E3, comme décrit précédemment par Westerfield (1994). Les embryons sont fixés par du paraformaldéhyde 4% dans du PBS 1X (PFA 4%) pendant une nuit à 4°C ou 3 h à température ambiante. Les embryons fixés peuvent être conservés plusieurs mois dans du méthanol 100% à -20°C avant utilisation.

### 5.3. L'hybridation:

Les embryons fixés sont réhydratés dans des bains successifs de 5min de méthanol-PBS 1X de concentration décroissante (25%, 50%, 75% et 100% PBS 1X). Les embryons sont ensuite placés 4 fois 5 min dans du PBS-T (PBS 1X, Tween 20, 0.1% (Sigma)). Les poissons sont perméabilisés par digestion enzymatique par la protéinase K (10 µg/mL dans PBS-T, Roche). L'incubation est dépendante du stade de développement des embryons :

- 30 sec pour les stades blastula et gastrula (3 à 10 hpf).
- 1 min pour les stades de somitogenèse précoce (de 10 à 20 hpf).
- 15 min pour les stades de somitogenèse tardif et pharyngula (de 20 hpf à 24 hpf).
- 30 min pour les stades supérieurs à 48 hpf.

Après une seconde fixation de 20 min au PFA 4% pour arrêter la réaction enzymatique, les embryons sont rincés 5 fois 5 min dans du PBS-T. Ces derniers sont ensuite incubés pendant 4 h à 70°C dans un mélange de pré-hybridation : formamide déionisé (Fluka) 50%, SSC 5X (solution 20X : NaCl 3 M, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,3 M, pH 7), Tween 20 0,1%, acide citrique 0,1 M pH 6, héparine 50 µg/mL, ARNt (Roche) 0,5 mg/mL, puis hybridés dans le même mélange contenant 200 ng de sonde sens (contrôle négatif) ou antisens, sur la nuit, à 70°C.

Afin d'éliminer les hybridations non spécifiques, les embryons sont préalablement lavés dans des conditions strictes de salinité et de température (70°C). Les embryons sont d'abord rincés rapidement avec une solution de pré-hybridation dépourvue d'héparine et d'ARNt. Puis, cette solution est substituée progressivement par des bains croissants de SSC 2X dilué dans la solution de pré-hybridation (25%, 50%, 75% et 100%). Deux derniers rinçages de 30 min chacun avec du SSC 0,2X sont réalisés à température ambiante. La substitution du SSC 0,2X par du PBS-T est ensuite réalisée par 4 bains successifs de 10 min



(75% SSC 0,2X / 25% PBS-T, 50% SSC 0,2X / 50% PBS-T, 25% SSC 0,2X / 75% PBS-T, 100% PBS-T). Les embryons sont incubés au minimum 4 h à température ambiante dans une solution de blocage (1 mg/mL BSA, 2% sérum de chèvre, PBS-T). La solution d'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim) utilisée pour révéler les sondes hybridées est diluée à 1/5000 final. L'incubation est réalisée sur la nuit à 4°C.

#### 5.4. Révélation et arrêt de la réaction :

Les anticorps excédentaires sont éliminés par 7 bains de PBS-T pendant 15 min. Ensuite, les embryons sont incubés 2 fois 5 min dans du tampon de révélation (0,1 M Tris HCl pH 9,5, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M de NaCl, Tween 20 0,1%) avant d'être mis en contact avec le révélateur NBT/BCIT (500 µg/mL NBT, 187 µg/mL BCIP). La révélation, à température ambiante, peut varier entre 10 min et plusieurs heures selon la sonde utilisée. Une fois l'intensité de marquage désirée obtenue, la réaction est stoppée par du PBS 1X contenant 10 mM d'EDTA pendant 1 h sous agitation et les embryons sont rincées 5 fois 5min en PBS 1X. Afin d'enlever le bruit de fond et d'augmenter le contraste, il est possible de placer les échantillons 20 min à température ambiante dans du PFA 4% puis dans du méthanol 100% pendant quelques minutes (le temps varie en fonction du contraste désiré). Pour leur conservation, les embryons sont placés dans des bains croissants, de 15 min chacun, de glycérol-PBS (75% PBS / 25% glycérol, 50% PBS / 50% glycérol, 25% PBS / 75% glycérol) et sont stockés dans du glycérol 100% à 4°C.

### 6. Localisation des protéines par immunofluorescence et marquages fluorescents:

#### 6.1. Prétraitement des embryons :

Après avoir mécaniquement déchorionné les embryons, si nécessaire, et les avoir anesthésiés à la tricaine, les échantillons sont fixés au PFA 4% 4h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Selon les anticorps ou marqueurs utilisés, les embryons peuvent être, ou non, stockés à -20°C dans du méthanol 100%.

## 6.2. Les anticorps :

Les anticorps suivant ont été utilisés :

- Les anticorps monoclonaux (banque d'hybridomes DSHB, USA) : l'anticorps anti dystrophine (1/150, MANDRA 1), Zn-8 (1/500), F59 (1/10) et S58 (1/200). Les anticorps polyclonaux anti-laminine (1/400, L9393), et anti- $\alpha$ -actinine (1/800, A7811) (Sigma).
- Les anticorps de lapin (1/200) et de cochon d'Inde (1/200) reconnaissant une répétition de quatre sous-domaines fibronectine III (FNIII) dans le domaine NC3 du collagène XII (reconnait à la fois le variant court et long) de poisson zèbre (Bader *et al.*, 2009) et l'anticorps reconnaissant le domaine vWA et une partie du domaine TSPN du collagène XXII du Danio Reiro (1/1000) ont été produits dans le laboratoire de Manuel Koch (Cologne, Allemagne).
- Les anticorps secondaires anti-IgG de souris couplés à la cyanine 2 (1/200), de lapin couplés à la cyanine 3 (1/400) ou de cochon d'Inde couplés à l'Alexa 488 (1/500), ont été utilisés pour cette étude

Des marqueurs fluorescents comme la phalloïdine–rhodamine 1/20 (Sigma P1951), et la coloration Hoescht 1/1000 (Sigma) sont également utilisés.

## 6.3. Immunomarquages et marquages fluorescent sur embryons entiers:

Les poissons fixés sont lavés 4 fois 15 min et 1 fois 30 min avec du PBS-T (PBS 1X pH7.4, tween 20 0,1%). Toutes les étapes sont réalisées en tube eppendorf 1,5 mL sous agitation. Les échantillons sont ensuite perméabilisés par passage de 5 min dans de l'eau distillée, puis un passage dans de l'acétone glacial à -20°C dont la durée varie en fonction des stades de développement : 5 min pour des embryons de moins de 24 hpf, 15 min pour des embryons de 24 à 48 hpf et 30 min pour les stades au-delà de 48 hpf. Les échantillons sont ensuite placés à température ambiante dans de l'eau distillée pendant 5 min avant d'être rincés 5 min dans du PBS-T. Pour les embryons de stade supérieur à 72 hpf, une seconde perméabilisation de 30 min à la protéinase K (10  $\mu$ g/mL, Roche) est réalisée. Les embryons

de plus de 72 hpf sont ensuite lavés 4 fois 15 min et une fois 30 min en PBS-T et traités 3 fois 1h en Triton 5% dans du PBS-T.

Les poissons sont incubés 1h à température ambiante dans une solution de PSBDT (2% de sérum de chèvre, 1% de BSA, 1% DMSO dans du PBS-T) pour éviter les fixations aspécifiques. Le PSBDT est ensuite remplacé par les solutions d'anticorps primaires ou par la phalloïdine couplée à la rhodamine diluées à la concentration optimale dans du PSBDT. L'incubation se fait sur la nuit à 4°C. Puis 4 lavages de 15 min suivies d'un de 30 min en PDT (PBS-T, DMSO 0,1%) sont réalisés. Les anticorps secondaires correspondants sont dilués en PSBDT et appliqués 4h à température ambiante. Cette étape, comme toutes les suivantes, est réalisée dans l'obscurité. Dans certain cas une solution de colorant Hoescht est ajoutée à 1/1000 (Sigma) durant les 5 dernières minutes d'incubation avec l'anticorps secondaire. Les embryons sont ensuite lavés dans 4 bains successifs de 15 min suivis d'un bain de 30 min en PDT. Le PDT est alors éliminé et remplacé par 3 gouttes de milieu de montage (Fluo Mounting Media, Dako) dans lequel les embryons peuvent être stockés plusieurs semaines à 4°C. Pour l'observation, les embryons sont montés entre lame et lamelle. Deux lamelles auront préalablement été collées aux extrémités de la lamelle pour empêcher l'écrasement des embryons, placés au centre de la lame, par la lamelle qui les recouvrira. Les échantillons sont observés au microscope à épifluorescence droit (Axioplan 2, Nikon) ou inversé (Nikon TE300) avant d'être observés en microscopie confocale (Leica SP5, PLATIM, IFR 128).

### **III. Technique de microscopie optique et électronique :**

#### **1. Prises de vues des embryons :**

##### **1.1. Stéréomicroscopie:**

L'observation des embryons à différents stades de développement est réalisée à l'aide d'une loupe Leica CLS 150X et l'acquisition des images est réalisée avec le logiciel LUCIA Image.

## 1.2. Vidéo-microscopie :

La mobilité des embryons a été enregistrée à l'aide un microscope (Leica MacroFluo, PLATIM, l'IFR 128) permettant des observations en lumière transmise ou en fluorescence. Les poissons sont observés à 5 jours de développement. Les poissons sauvages étant trop rapides permettre pour la prise de vue, ces derniers sont placés dans un milieu visqueux (méthylcellulose 0,6% dans du E3) pour ralentir leur déplacement. Les morphants MO22 sont observés dans du E3 ou en méthylcellulose comme indiqué. Les séquences d'enregistrements durent 30 sec avec une prise de clichés toute les 0,5 sec. Les données ont été traitées à l'aides des logiciels Metaview et Image J.

## 2. Observation des microstructures en microscopie électronique à transmission :

### 2.1. Préparation et inclusion des échantillons :

Les embryons sont fixés dans du cacodylate 0,1M, pH 7,4, 1,5% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde (Sigma). La fixation se réalise à température ambiante pendant 24 h ou 3 à 5 jours à 4°C. Une fois fixés, les échantillons sont lavés 3 fois 10 min dans une solution de cacodylate 0,1M pH 7,4, 10% sucrose puis post-fixés avec une solution de tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ , TEM) 1%, dilué dans le cacodylate 0,1M, sucrose 8% pendant 30 à 40 min à température ambiante. Les embryons sont rapidement rincés dans de l'eau distillée et déshydratés par passages successifs de 5 min, dans des bains d'éthanol de concentration croissante (30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100% éthanol).

Les poissons sont alors préparés pour l'inclusion par passage de 10 min dans de l'oxyde de propylène (substitution). L'oxyde de propylène est ensuite substitué par un mélange d'Epon pur [Epon A et B (v/v), 1,72% fixateur BDMA] et oxyde de propylène (V/V). L'imprégnation est réalisée tout d'abord pendant 1 h puis une nuit à température ambiante dans de l'Epon pur. Le jour suivant le bain d'Epon est changé par de l'Epon pur frais, avant l'inclusion des échantillons dans des moules à plat ces derniers sont placés à 60°C pendant pour polymérisation.

## 2.2. Coupes semi-fines et ultrafines:

Les coupes semi-fines (0,5  $\mu\text{m}$ ) sont réalisées avec un microtome (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1). Les coupes semi-fines sont déposées sur une lame en verre préalablement dégraissée dans de l'alcool 100% / éther (volume à volume), puis séchée sur une plaque chauffante. Les coupes sont ensuite colorées au bleu de méthylène-Azur II (volume à volume) puis montées au Depex avant d'être examinées en microscopie optique (Leica, DM 4000 B).

Les coupes ultrafines (70 nm) sont réalisées avec un ultramicrotome (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1). Les coupes sont récupérées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de Formvar et contrastées avec de l'acétate d'uranyle 7% dans du méthanol puis au citrate de plomb avant d'être observées en microscopie électronique à transmission (Phillips, CM 120) à 80 KV, équipé d'une caméra numérique digitale Gatan Orius 200 2Kx2K.

## IV. Méthodes de biologie moléculaire :

### 1. Extraction et purification d'ARN :

Les extractions d'ARN sont réalisées sur 20 embryons. Les embryons sont lavés en eau DEPC (traité au DiEthyle PyroCarbonate, Sigma). L'eau est ensuite substituée par 250  $\mu\text{L}$  de TRIZOL (Invitrogen). Les poissons sont incubés 5 min sur la glace avant d'être lysés par aspiration/refoulement à l'aide d'une seringue stérile 1 mL équipée d'une aiguille 25 G. Les extraits peuvent être stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant utilisation. Les extraits sont incubés 5min à température ambiante, 50  $\mu\text{L}$  de chloroforme sont ajoutés et le mélange est homogénéisé au Vortex pendant 15 s. Les échantillons sont laissés au repos pendant 3 min avant d'être centrifugés 15 min, 12000rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le milieu réactionnel est alors composé de deux phases séparées par un précipité de protéine. La phase aqueuse contenant les ARNs est récupérée et 250  $\mu\text{L}$  d'éthanol 75% sont ajoutés. Après un bref passage au Vortex, les tubes sont centrifugés 5 min, à 7000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 15

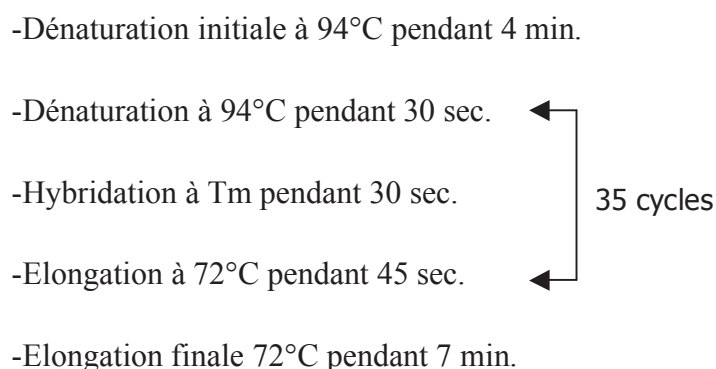
$\mu$ L d'eau DEPC. Les ARNs sont dosés par mesure de l'absorbance à 260nm (Eppendorf, BioPhotometer) . Les échantillons peuvent alors être congelés à -80°C avant utilisation.

## 2. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR:

3  $\mu$ g d'ARN sont incubés avec des oligonucléotides « Random » (Promega), s'hybridant sur les séquences répétées d'ARN ou « dT » (Promega) se fixant aux queues polyA. Ces séquences serviront de point de départ de la retrotranscription. L'hybridation est réalisée grâce à 70°C pendant 10 min. Le milieu réactionnel de la RT-PCR est ensuite ajouté. Il est composé d'un tampon d'incubation 10X, 200U de rétrotranscriptase M-MLV, un mélange de 10 mM de dNTPs et 20 U d'un inhibiteur de RNases (RNAsin plus). Tous ces réactifs sont fournis par Promega. La rétrotranscription est réalisée à 37°C pendant 1 heure. Les ADNc ainsi synthétisés peuvent être congelés à -20°C avant utilisation.

## 3. PCR classique :

Les séquences d'intérêt portées par les ARNc sont amplifiées par PCR. Pour cela des couples d'amorces spécifiques sont dessinés et synthétisés (Sigma). Les amorces (Tableau 3) sont ajoutées à raison de 10 mM final dans le milieu réactionnel, tampon pour Taq polymérase (BioLabs) 1X final, de 0,5 U de Taq polymérase (BioLabs) et de 10 mM de dNTPs (Promega). Deux thermocyclers ont été utilisés indifféremment (BioRad mycycler et Biometra T gradient) selon le programme suivant :



Les produits de PCR sont déposés sur gel agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (Euromedex) et visualisés sur une plaque UV ( $\lambda=312$  nm).

Nom de l'amorce	séquence	Tm
Sapje F	5' CTTCTTGGAAGGTTCTGGTTGG 3'	65°C
Sapje R	5' AAACAGCCAGCTGAACCAAT 3'	
Col22a1 F	5' GTGGGCAAGGAGAATTTTGA 3'	63°C
Col22a1 R	5' CGTTTGACCTCCTCCAATGT 3'	
β-actin F	5' AAGCAGGAGTACGATGAGTCTG 3'	60°C
β-actin R	5' GGTAACGCTTCTGGAATGAC 3'	
FGF4 F	5' GTGGAGAGGGGAGTTGTGAC 3'	63°C
FGF4 R	5' TGCATTCGTTTGTGAACTGC 3'	
FGF8 F	5' AATCCGGACCTACCAGCTTT 3'	60°C
FGF8 R	5' TCGTTTAGACCGTCTGTTG 3'	
SCX F	5' AGCCGTGGTGGTGGTAGTAG 3'	60°C
SCX R	5' TAGTGTCGGAGGATGATGAA 3'	

**Tableau 3 : Liste des couples d'amorces utilisés.**

#### 4. Génération de clones bactériens :

##### 4.1. Ligation :

Les inserts obtenus par PCR classique sont purifiés sur colonne (Wizard SV gel and PCR Clean up System, Promega). Le clonage est réalisé en utilisant le kit TOPO-PCRII selon les instructions du fournisseur (Invitrogen). La ligation est réalisée sur la nuit à 14°C.

##### 4.2. Transformation de bactéries compétentes :

Les bactéries compétentes de type TOP-10 One Shot (Invitrogen), stockées à -80°C, sont déposées sur la glace pendant 5min. Le produit de ligation est ajouté et l'ensemble est incubé 15 min sur la glace puis 30 sec à 42°C (choc thermique) et remis immédiatement sur la glace. 250 µL de milieu de culture SOC (Invitrogen) sont ajoutés et les



bactéries sont incubées 1h à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées sur une gélose LB agar supplémentée en carbénicilline (Euromedex) et en X-Gal/IPTG ce qui permet de faire une sélection par apparition de colonies blanches/bleues. Les cultures sont réalisées sur la nuit à 37°C.

#### 4.3. Préparation des plasmides et archivage des clones :

Le lendemain, les colonies blanches sont repiquées dans 4 mL de LB additionnés de carbénicilline et cultivées au moins 18 h à 37°C sous agitation. Après lyses des bactéries, les plasmides sont ensuite récupérés et purifiés sur colonne (Kit Miniprep plasmid prep, Macherey-Nagel) avant d'être élués dans 50 µL d'eau sans nucléase et dosés au spectrophotomètre à  $\lambda=260$  nm (Eppendorf, BioPhotometer). Les plasmides sont alors séquencés (GATC, Lyon). Si la séquence est correcte, le clone est archivé et placé à -80°C dans un mélange volume à volume de LB carbénicilline et de glycérol stérile.

### V. Analyses Biochimiques :

#### 1. Extraction des protéines:

Les protéines sont extraites à partir de 20 poissons dans deux conditions. Une condition non dénaturante utilisant un tampon de lyse (NP-40 10%, EDTA 0,5 M, un cocktail d'inhibiteur (Roche) 1X final, PBS 1X pH 8) et une condition dénaturante utilisant un tampon de lyse contenant du SDS 2%, Tris-HCl 100 mM pH 6,8. Les poissons sont broyés 15 min à 30 rpm/sec (Tissue-Lyser, Quiagen). Les lysats sont centrifugés 30 min à 15000 rpm. 20 µL de lysat sont conservés pour réaliser un dosage protéique. Le reste du lysat est stocké à -80°C avant utilisation.

#### 2. Précipitation des protéines :

Les protéines sont précipitées par 10% TCA (TriChloroAcétate) en présence de 0,1% triton X-100, pendant 30 min dans la glace, puis centrifugées à 15000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 100% froid et de nouveau centrifugé

pendant 10 min à 15000 rpm à 4°C. Après centrifugation, le culot est séché et repris dans du tampon Laemmli 1X (Tris/HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4%, Glycérol 20%, Bleu de Bromophénol 0,0025% (Laemmli, 1970)) en condition réductrice (10 mM de DTT). Les échantillons peuvent alors être congelés à -20°C avant d'être analysés.

### **3. Electrophorèse SDS-PAGE :**

Les échantillons sont chauffés 3min à 95°C puis déposés sur un gel d'électrophorèse, composé d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 4% final, APS 0,02%, TEMED 0,01%) et un gel de séparation à 15% (Tris-HCl 375mM pH 8,8, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 15% final, APS 0,05%, TEMED 0,05%). La migration est réalisée dans un tampon Tris-HCl 25 mM, Glycine 250 mM et SDS 0,1% pH 8,3.

### **4. Immunotransfert :**

Après séparation des protéines en SDS-PAGE, le gel est placé sur une membrane (Immobilon-P, Millipore) préalablement imbibée dans du méthanol 100% puis rincée dans un tampon de transfert (méthanol 5% dans du CAPS 1X, pH 11). Le transfert est réalisé sur la nuit à 200 mA dans une cuve électrophorétique (Biorad).

Après transfert, les membranes sont rapidement rincées au PBS 1X et colorée au rouge ponceau 0,2% dilué dans de l'acide acétique 1% pendant 15 min sous agitation. Cette coloration permet de repérer les marqueurs de poids moléculaire et contrôler l'efficacité du transfert. Après un bref rinçage à l'eau distillée, les membranes sont placées, pendant 1 h à température ambiante, dans une solution composée de lait écrémé à 10% dans du PBS-T 1X visant à bloquer les sites d'interactions aspécifiques des anticorps. Après trois rinçages de 5 min au PBS-T, les membranes sont disposées dans une chambre humide, sur une feuille de Parafilm, et recouvertes par les solutions d'anticorps primaires correspondant. Les anticorps anti-collagène XXII au 1/100000, et anti-collagène XII de lapin au 1/1000 ont été utilisés. La chambre est ensuite placée à 4°C

sur la nuit. Les membranes sont rincées 5 fois 5 min au PBS-T. Les anticorps secondaires correspondant sont alors déposés (anticorps anti-lapin couplés à la peroxydase 1/3000) sur les membranes et incubés 1 h à température ambiante. Les protéines d'intérêt sont alors révélées à l'aide d'un kit de chimioluminescence (Detection Reagent, Amersham Bioscience) et révélées sur un film photographique (BioMax, Kodak).

## **5. Test de digestion par la collagénase :**

Les extraits protéiques sont centrifugés 30 min, 15000 rpm à 4°C. 20 µL de surnageant sont prélevés. 4 µL de surnageant sont également prélevés comme contrôle négatif et le tube est immédiatement placé dans la glace tout au long de la manipulation. Aux 20 µL de surnageant sont ajoutés 50 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM d'inhibiteurs de protéases AEBSF (Roche) et du PBS-T pH 7,2 auxquels sont ajoutés (essai) ou non (témoin) 3 U de collagénase (Worthington). Les tubes sont incubés 4 h à 37°C. 3 µL de chaque échantillon sont placés en tampon Laemmli plus DTT 1mM et chauffés 5min à 95°C avant d'être séparés sur gel SDS-PAGE 6%. Le collagène XII est ensuite révélé par immunotransfert, comme décrit en 4.4.

## **6. Etudes des interactions protéiques par résonance plasmonique de surface (Biacore) :**

Un mélange de laminines de souris (Sigma, L2020) et du collagène VI, extrait par la pepsine, de placenta humain (fourni par T. Sasaki, Martinsried, Allemagne) ont été immobilisés de façon covalente sur une « sensor chip » CM5 par l'intermédiaire de leurs groupements amines primaires (-NH<sub>2</sub>). La surface de dextran carboxyméthylé de la « sensor chip » est activée par injection d'une solution composée de 0,2 M N-éthyl-N'-(diéthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et 0,05 M de N-hydroxysuccinimide (NHS). Les laminines et le collagène VI sont dilués dans un tampon acétate de sodium 10 mM, pH 4 avant d'être injectés sur la surface active de la « sensor chip ». Les groupements de résidus actifs sont bloqués par injection d'1M d'éthanolamine pH 8,5. Les protéines sont immobilisées à un niveau d'unité de résonance (RU) équivalent à 11472 RU pour les

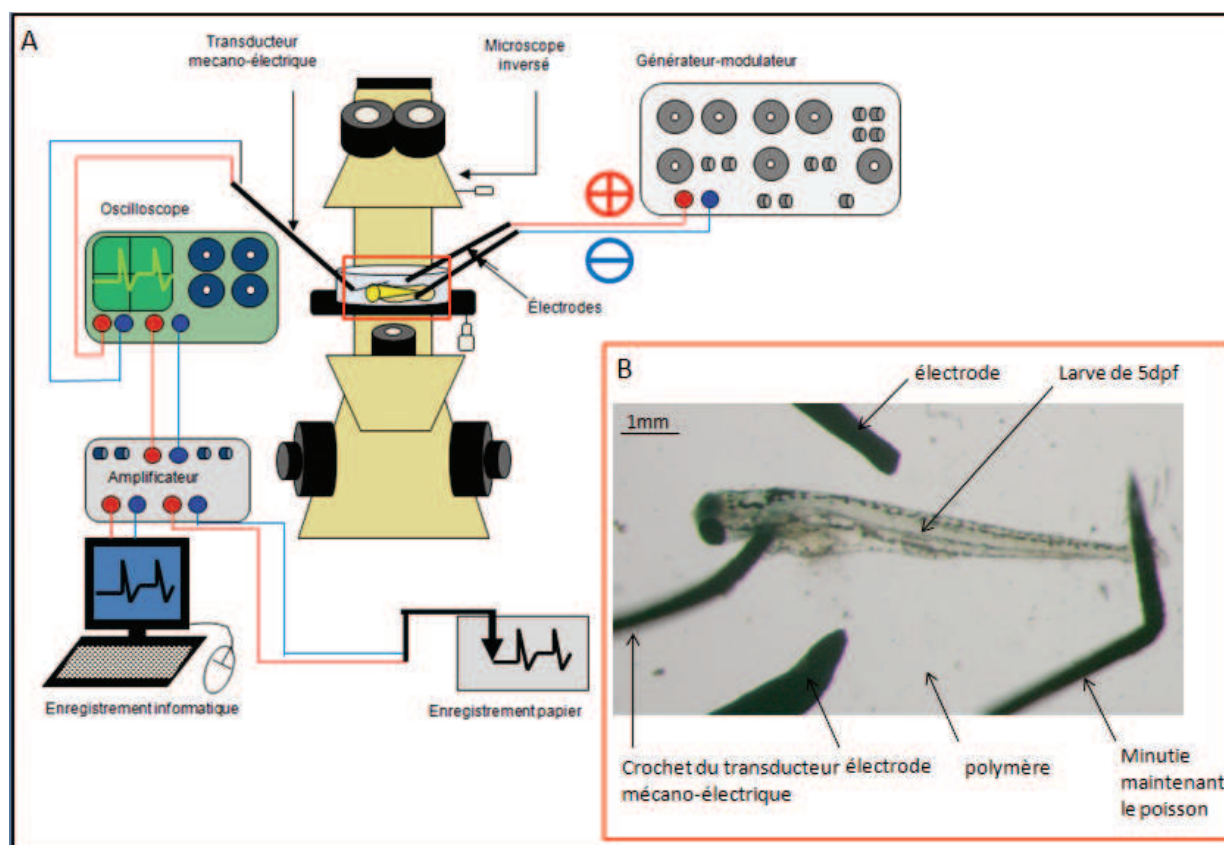
laminines et de 6532 RU pour le collagène VI. Une cellule contrôle du flux en absence de couplage protéique est activée par le mélange NHS-EDC et désactivée par 1 M d'éthanoamine pH 8,5. Une solution de 50mM Tris pH 7,6, 0,15 M NaCl (volume à volume) et 0,05% de surfactant P20 est utilisé comme tampon de course. Les sensorgrammes témoins en absence d'interaction ainsi obtenus sont directement soustraits des sensorgrammes obtenues (Biacore T100 Control Software, version 2.0.1) après injection du domaine recombinant vWA du collagène XXII de poisson zèbre (40 µg/mL) sur les protéines immobilisés (laminines et collagène VI), à raison de 30 µL/min pendant 4min. La « sensor chip » est régénérée par une injection d'une solution composée d'1,5 M NaCl et 1,5M de chlorure de guanidine.

## **VI. Mesure de contractions musculaires :**

Les larves de poisson zèbre (25 sauvages et 23 morphants) de 5 dpf sont transférés dans une solution de Tyrode (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes pH 7,2). Elles sont euthanasiées par écrasement de la tête avec des pinces ultrafines (Tweezers n°5, Dumont) car l'utilisation de la tricaïne serait susceptible d'interférer avec la réponse musculaire induite par électrostimulation. La boîte de Pétri dans laquelle est réalisée l'expérience est recouverte d'un polymère permettant d'y empaler la queue du poisson à l'aide d'une minutie. Un crochet fixé sur le transducteur mécano-électrique (AE801), lui-même relié à un micromanipulateur, est accroché sur la tête du poisson et l'étirement de son corps est ajusté avec le micromanipulateur (figure 25). Le signal correspondant à la force musculaire du poisson est échantillonné à la fréquence de 1 kHz et numérisé à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique (National Instrument) et enregistré sur le disque dur d'un ordinateur grâce au logiciel WinWCP (Université de Strathclyde, UK). L'ensemble de la musculature du poisson est stimulée par application des impulsions électriques supraliminaire de 0,5 ms.

Pour chaque poisson testé, l'intensité des impulsions électriques est progressivement augmentée jusqu'à l'obtention d'une réponse contractile maximale. Cette intensité de stimulation, augmentée d'au moins 10%, est sélectionnée pour réaliser les mesures. Une fois l'intensité de stimulation sélectionnée, le corps du poisson est

graduellement étiré et relâché jusqu'à obtention d'une réponse contractile maximale. Il est à noter que le transducteur mécano-électrique est sensible aux vibrations, aux bruits et à la lumière. Les manipulations sont donc réalisées dans l'obscurité, sur une table anti-vibration. Une cage de Faraday a été utilisée pour limiter le bruit de fond généré par les autres appareils électriques.



**Figure 25 :** (A) Schéma de l'appareillage nécessaire à la mesure des contractions musculaires. (B) agrandissement du dispositif de stimulation/enregistrement fixé sur la larve. Illustration originale.

# Résultats

## Synopsis :

La première partie du chapitre dédié aux résultats concerne une étude qui a pour but de décrire les changements morphologiques de la JMT au cours du développement du poisson zèbre et de schématiser les étapes clé de ce processus. Le nombre grandissant d'études s'intéressant aux défauts de la JMT chez le poisson zèbre en particulier comme modèle d'étude de certaines dystrophies musculaires, justifie pleinement cette étude. Ces observations, réalisées en MET, couvrent la période comprise entre 24hpf et 2 ans (âge adulte) de développement. Nous avons pu observer que la mise en place de cette structure est intimement liée au développement musculaire et tendineux.

À 24hpf, les myotomes, issus de la différenciation des somites deviennent fonctionnels avec l'apparition des premiers mouvements de l'embryon. L'observation de l'ultrastructure du muscle à ce stade révèle une différenciation inachevée de ce tissu. Concomitant à l'élongation des fibres musculaires, les premiers microfilaments d'actine, qui constitueront les sarcomères, et leur ancrage au sarcolemme au niveau de la future JMT sont observés. Le myosepte est acellulaire et ne contient que très peu de matériel matriciel. L'interface muscle/myosepte est rectiligne. La mise en place de la jonction commence de fait par la production d'une lame basale, inachevée à 24hpf par les cellules musculaires.

À 48hpf, les myofibrilles sont complètement différenciées alors que l'intensité des forces appliquées sur la JMT augmente, les mouvements de l'embryon s'intensifiant. Les régions en forme de triangle, formées par la rencontre de deux somites consécutifs et de la notochorde, sont colonisées par des cellules de type fibroblastique. Ces cellules vont émettre des prolongements cellulaires qui pénètrent le myosepte sur toute sa longueur. À ce stade de développement, le myosepte forme une bande de tissu fibreux d'une épaisseur d'environ 200nm seulement. Il contient des fibres de collagènes éparses de 30nm de diamètre sans organisation particulière. La lame basale qui sépare le muscle du myosepte est complètement formée et le sarcolemme commence à s'invaginer. On observe l'apparition de densifications



sub-sarcolemmales où les microfilaments d'actine issus de la dernière strie Z viennent s'ancrer.

À 72hpf, aucun changement morphologique majeur n'est observée excepté une augmentation importante de l'épaisseur du myosepte qui s'élève alors à 500nm et du matériel fibrillaire qu'il contient. Au niveau de la JMT, les invaginations du sarcolemme se font plus profondes au point de rencontre entre les filaments d'actine et le sarcolemme.

Un profond changement de morphologie de la JMT est observé chez les larves de 6 jours. Les fibres de collagène qui composent le myosepte sont nombreuses et régulièrement espacées. Dans certaines régions du myosepe, les fibres de collagènes sont organisées en feuillets perpendiculaires. Le diamètre de ces fibres reste inchangé. Un fait marquant est la colonisation plus importante du myosepte par des cellules de type fibroblastique, qui sont observées non plus uniquement dans les régions triangulaires mais dans toute l'épaisseur du myosepte. Les filaments d'actine et les fibres de collagènes s'alignent sur un même axe. Ce changement de morphologie se perpétue jusqu'à l'obtention d'un lien moléculaire évident, car très dense aux électrons, entre le cytosquelette sarcomérique et les fibres de collagène au niveau de la jonction myotendineuse observée à l'âge adulte (2 mois).

Chez le poisson adulte, le myosepte mesure 3mm d'épaisseur. Il est composé de fibres de collagène d'environ 50nm de diamètre, organisées en contre-plaqué, selon des axes orthogonaux. La JMT est formée d'interdigitations extrêmement régulières entre le sarcolemme et la matrice fibreuse du myosepte. Le cytosquelette de la fibre musculaire vient s'ancrer dans le creux de ces invaginations au niveau des densifications sub-sarcolemmales.

À partir de ces observations, il nous a été possible d'établir un modèle schématique retraçant les étapes critiques de la formation de la JMT, structure très peu documentée dans la littérature. Ces observations qui font l'objet d'un manuscrit en préparation (publication 1 de ce document) constitue le premier atlas décrivant la morphogenèse de la JMT chez le poisson zèbre.

La seconde partie de ce chapitre présente une étude concernant la caractérisation et le profil d'expression du collagène de type XII chez le poisson zèbre. Ce collagène qui appartient au sous-groupe des FACITs, est associé aux fibres de collagène I dans de nombreux tissus, dont les tendons, chez les mammifères. Son rôle *in vivo* n'a pas encore été

élucidé. Une étude, majoritairement réalisée par Hannah Bader (ancienne doctorante du laboratoire), a permis de caractériser biochimiquement le collagène XII chez le poisson zèbre et de déterminer son patron d'expression des transcrits et de la protéine, à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre un domaine recombinant de la protéine. Cette étude constituait une première étape en vue d'une étude fonctionnelle du collagène XII chez le poisson zèbre. Les résultats obtenus ont été publiés dans le journal *Matrix Biology*. Ma contribution dans cet article a été de réaliser des expériences concernant la caractérisation biochimique du collagène XII chez le poisson et permettant l'optimisation du protocole d'immunofluorescence *in toto*.

Nous avons montré qu'un gène orthologue du collagène XII, *coll2a1*, de mammifère était présent dans le génome du poisson zèbre. Cependant, contrairement aux tétrapodes où deux variants ont été décrits (forme longue et forme courte), il n'a pas été retrouvé de variant d'épissage chez le *Danio rerio*, et le gène décrit code pour la forme courte de ce collagène. Des anticorps anti-collagène XII de poisson zèbre ont été générés et sa spécificité a été testée notamment en obtenant un profil de digestion des domaines COL par la collagénase.

L'expression du collagène XII débute pendant la somitogénèse à 10 somites. Durant le développement (jusqu'à 72hpf), les transcrits sont retrouvés dans différentes régions du cerveau, autour de nombreuses structures comme les vaisseaux sanguins, le tube néphrétique, du tube neural, dans les myoseptes, la peau, les nageoires pectorales et d'une façon générale dans tous les membranes fibreuses entourant les organes, appelés fascias. Pour les protéines de la matrice, il n'est pas rare que la localisation de la protéine soit différente de celle des ARNm, et que la protéine perdure dans les tissus alors que l'ARN n'est plus exprimé. C'est pourquoi un patron d'expression à l'échelle de la protéine a également été réalisé. Les immunofluorescences ont révélé la présence du collagène XII dans tous les fascias et les lames basales de l'embryon. Le signal obtenu avec l'anticorps anti-collagène XII co-localise avec celui obtenu avec un anticorps anti-laminines. Le collagène XII a été détecté à l'interface épiderme/derme, dans les nageoires, les myoseptes (horizontaux et verticaux), le périchondre (structure entourant le cartilage) mais également autour des reins et de la veine caudale. Des observations en MET ont confirmé la présence du collagène XII soulignant les lames basales mais aussi sur des fibres de collagène dans le derme. Ce patron d'expression coïncide avec celui décrit pour la souris, lorsque les tissus ont été étudiés. Par contre, les patrons

d'expressions décrits chez la souris n'ont pu mettre en évidence la localisation unique de ce collagène dans les fascias.

La localisation du collagène XII dans les fascias et au niveau des lames basales suggère que ce collagène pourrait jouer un rôle dans la cohésion tissulaire et la déformabilité des tissus, rôle qui avait été suggéré dans la littérature. L'expression ubiquitaire de ce FACIT pourrait s'avérer être un problème dans l'optique d'une étude fonctionnelle chez le poisson zèbre.

La troisième et dernière partie de ce chapitre traite du projet majeur de ma thèse. Ce projet visait à déterminer le rôle du collagène XXII dans le développement du poisson zèbre. Au cours de cette étude, nous avons mis au point des protocoles originaux comme le couplage mécano-électrique ou la micro-injection de protéine.

Le collagène XXII a été découvert en 2004 par le Prof M. Koch et a été décrit comme un marqueur des jonctions tissulaires, en particulier au niveau de la JMT chez la souris. Sa fonction était inconnue. Comme le collagène XII, il appartient à la sous-famille des FACITs.

Un orthologue du gène codant pour le collagène XXII, *col22a1*, est retrouvé sur le chromosome 19 du poisson zèbre. Par hybridation *in situ* sur l'embryon entier, j'ai pu détecter un signal à partir de 22hpf dans tout le somite. Par RT PCR, j'ai montré que *Col22a1* est exprimé à 18hpf et augmente fortement à 28hpf. De façon corrélée au développement de la JMT, le signal va progressivement se restreindre aux extrémités des fibres musculaires au point d'ancrage sur la JMT. Par immunofluorescence en microscopie confocale, j'ai montré que la protéine est exclusivement déposée à la JMT à partir 28hpf. Par différentes approches (RT PCR, utilisation d'inhibiteurs de la voie FGF, utilisation de mutant *Ace*,...) j'ai pu montrer que l'expression de collagène XXII est FGF8-dépendante.

Pour déterminer le rôle de ce FACIT, une étude fonctionnelle utilisant la stratégie morpholino « knock down » a été réalisée. Deux morpholinos de traduction ont été dessinés ainsi qu'un morpholino contrôle (mismatch), contenant 5 substitutions de nucléotide. Les poissons injectés avec les morpholinos spécifiques du collagène XXII seront notés MO22. Les embryons MO22 présentent un défaut de nage et un aspect dystrophique des myotomes résultant du détachement des fibres musculaires. La force musculaire des larves MO22 a été

mesurée par analyse du couplage mécano-électrique et comparée aux larves sauvages. Ces analyses montrent une diminution drastique de la force contractile des poissons MO22. L'absence de collagène XXII entraîne une diminution, à la fois de l'expression et de l'activation, de la voie de signalisation AKT impliquée dans la signalisation intracellulaire en réponse au stress mécanique. Les ERK 1/2 et leur activité ne sont pas affectées.

La détection par immunofluorescence de marqueurs des différentes structures, comme le collagène XII (myoseptes), laminines (lames basales),  $\alpha$ -actinine (muscle),..., révèle des altérations morphologiques provoqués par l'absence de collagène XXII. Les myoseptes paraissent désorganisés et sont parfois interrompus, permettant la formation de fibres géantes traversant deux myotomes adjacents. Les marquages des différentes chaînes lourdes de myosine avec les anticorps S58 et F59 montrent que les fibres lentes et rapides sont toutes deux atteintes.

Les observations en microscopie électronique de la JMT de larves MO22 montrent que la MEC du myosepte est désorganisée, moins dense et envahie par de nombreux fibroblastes. La lame basale du muscle et le sarcolemme sont intacts et le site de rupture se situe entre la lame basale et les fibres de collagène du myosepte. Comme pour les mutants *caf* (mutant *lama2*) et contrairement aux mutants *sapje* (mutant dystrophine) pour lesquels l'intégrité du sarcolemme est altérée, la dégénérescence des fibres musculaires est déclenchée par le détachement musculaire. C'est donc la fragilisation de la JMT qui cause le détachement des fibres musculaires.

La restauration du morphotype des embryons MO22 ne pouvant être effectué par injection de l'ARNm *col22a1* à cause de sa grande taille, le collagène XXII entier humain et le domaine vWA du collagène XXII de *Danio rerio* ont été produits de façon recombinante puis co-injectés avec les morpholinos MO22. Dans les deux cas, nous observons un sauvetage du morphotype. L'application de stimulations électriques répétées sur les muscles du tronc ont toutefois permis d'observer que seule la protéine entière est capable de restaurer le phénotype.

Nos résultats montrent que le collagène XXII est un composant crucial des complexes d'ancrage du muscle et que son absence résulte dans l'apparition d'un phénotype dystrophique. Les résultats obtenus permettent de considérer le gène *col22a1* comme un gène candidat pour les dystrophies musculaires. Le fait que son expression soit régulée par la voie

de signalisation FGF permet d'envisager leur utilisation pour réparer des ruptures de la JMT suite à un traumatisme.

# Publication I:

## **The development of myotendinous junction in zebrafish**

Benjamin Charvet, Marilyne Malbouyres, Aurélie Pagon-Minot, Florence Ruggiero, Dominique Le Guellec

*En préparation*

### **The development of myotendinous junction in zebrafish**

Benjamin Charvet<sup>1</sup>, Marilynne Malbouyres<sup>1</sup>, Aurélie Pagon-Minot<sup>2</sup>, Florence Ruggiero<sup>1</sup>, Dominique Le Guellec<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université Lyon 1, UMR CNRS 5242, IFR128 Lyon Biosciences, 46 Place d'Italie, 69368 Lyon cedex 08

<sup>2</sup> Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS UMR 5086, IFR 128, Université de Lyon ; Université Lyon 1, France ; 7 passage du Vercors 69367 Lyon cedex 07

\*corresponding author : IBCP, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07

Tel : +33 3 72 72 26 60 ; Fax : +33 4 72 72 26 04. Email adress : [d.leguellec@ibcp.fr](mailto:d.leguellec@ibcp.fr)

Key words : zebrafish ; extracellular matrix ; myosepta ; myotendinous junction ; collagen



## Introduction

Myotome is comprised of skeletal muscle fibres derived from somites. Somites are repeated structures that are delineated by the formation of somites boundaries. The boundaries that separate myotomes have been called in many different ways including myotendinous junction (MTJ), myoseptum, myoseptal tendon and myomomal junction. In fish the MTJ is the major site of force transmission during swimming behaviour (Gemballa and Vogel, 2002). As in humans, the MTJ can also react to compressive loads (Summers and Koob, 2002), the zebrafish tendon is thus functionally homologous to the mammalian tendon. The MTJ is derivated from the initial epithelial somite boundary and links two adjacent muscle cells. Muscles and the MTJ constitute integrated mechanical unit. Structurally, the MTJ consists of the actin microfilaments that extend from the last Z-line, actin-binding proteins that bundle the actin filaments together, proteins that link the actin filament bundles to the sarcolemma, transmembranes protein complex that link cytoskeletal elements to basal lamina components, and proteins that link the basal lamina to the collagen-fibril rich matrix outside it. Two separate transmembrane-linkage systems have been described in the MTJ. The first system contains the dystrophin-associated glycoproteins complex (DAPC), which forms a pivotal link between

the muscle cytoskeleton and the extracellular matrix. Many critical members of the DGC have been described in zebrafish (Guyon *et al.*, 2003), including dystrophin,  $\beta$ -dystroglycan, and  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\gamma$ -, and  $\zeta$ -sarcoglycan. Dystrophin and the DAPC in zebrafish may play a highly conserved role in muscle architecture and contraction. The second system contains the main receptors of collagens, the integrins, which create mechanical link between muscle cells and ECM by binding actin microfilaments on the cytoplasm side of sarcolemma and ECM molecules on the extracellular side. Several focal adhesion molecules including vinculin, FAK, paxillin and talin have been identified in zebrafish. The molecular composition of the myoseptal matrix is unknown. Myosepta and skin are firmly interconnected in the region between the dorsal and ventral backward flexure of the myoseptum. The major proteins described in mammalian tendon, including collagen, tenascin, fibronectin, and laminin have been characterized in zebrafish, but their spatio-temporal localization in myosepte and their role are unclear. Only the localisation and the function of periostin are well documented but is not present in mammalian tendons (Kudo *et al.*, 2004). The collagen-fibre architecture of myosepta shows a high uniformity in gnathostomes indicating a functional importance of myosepta in axial undulatory swimming (Gamball *et al.*, 2003). The formation of the collagen network and

the composition of collagen fibres are unknown.

The analysis of the complex and dynamic interactions between muscle cell and ECM components is vital to understand the functional physiology of myosepta. In this paper, we described the ultrastructure of myosepta and we established an atlas of myoseptal development in zebrafish.

## *Materials and methods*

### **Zebrafish strains and breeding**

All experiments were performed using the wild type (AB/TU) strain. General maintenance, collection and staging of adult and embryo zebrafish were carried out at the zebrafish facilities (PRECI-IFR128, France). They were reared and maintained at a constant temperature of 28°C in a 14-hr light cycle in compliance with UK Home Office and French Government guidelines.

### **Ultrastructural studies**

As described previously (Le Guellec *et al.*, 2004), zebrafish embryos were fixed in 1.5% glutaraldehyde and 1.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) overnight at 4°C followed by washing in 0.1 M cacodylate buffer, 10% sucrose (1h, 2 times). After post-fixation in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature,

samples were dehydrated in graded series of ethanol (from 30 to 100%), and embedded in epoxy resin. 1µm thin sections were fixed on glass slides and stained with Toluidine Blue for optical microscopy observations. For transmission electron microscope analysis, ultra-thin 50 nm sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed with a Philips CM120 electron microscope (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon 1, France) equipped with a Gatan Orius 200 2Kx2K digital numeric camera.

## *Results*

The following description of myosepta development in zebrafish is based on longitudinal sections of the caudal peduncle, at the level of the elongated part of the yolk. It is important to precise this point because somite differentiation progresses from anterior to posterior and then the features of the zebrafish myosepta morphology in embryo, larva, juveniles and adults can differ depending on the regions of the body. Our description is focused on vertical myosepta.

Myoseptum develops during the segmentation period as one goes along somite formation. Myoseptum is derived from the initial epithelial somite boundary. These epithelial cells can adhere on ECM molecules through different cell transmembrane proteins such as integrin or

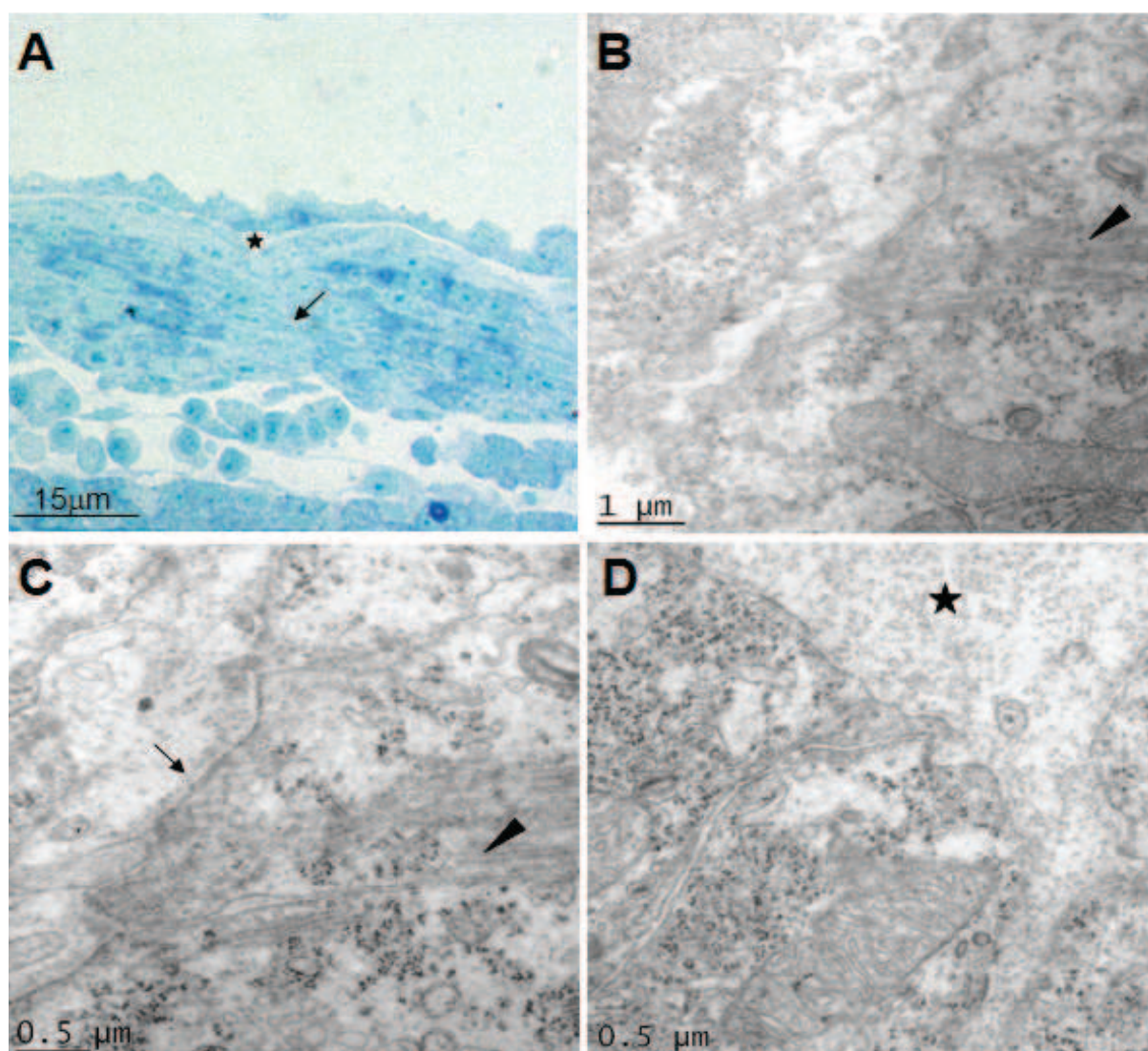
dystroglycan complex (DAPC) (Guyon *et al.*, 2003). Adaxial cells, the precursors of slow-twitch fibres, migrate laterally from the medial region of the somite through the fast-twitch muscle region. The migration process is accompanied by fast-twitch muscle cell elongation, which attach strongly to the nascent MTJ. At 24 hpf, the migration of adaxial cells is achieved and slow-twitch fibres are the most superficial layer of muscle. A low number of myofibrils are observed in muscle cells. These myofibrils are preferentially located in the cortex area of the cells (figure 1 B, C). Sarcolemma do not exhibit irregularities as observed at later stages. The basement membrane is not well differentiated. It is often fragmented and sometimes hardly visible along the muscle cells (figure 1 C). At this stage, the organisation of the myoseptal collagen matrix is irregular. Myosepta are acellular and are composed of thin sparse collagen fibres. Cell processes can only be observed at the intersection with primary stroma of the dermis. The fibril diameter is about 30 nm, with irregular space in between (figure 1 D).

In 48 hpf zebrafish embryos, myofibrils are completely developed and the cytoplasm is overgrown with myofibrils. Each myofibril is surrounded by a well-developed sarcoplasmic reticulum. From the last Z-line, thin microfilaments link to the muscle cell membrane. The anchorage of these actin-filaments is perpendicular to the membrane surface or microfilaments are attached

obliquely. A high density of polysomes is observed between the thin filament bundles, indicating intense a protein synthesis activity. Glycogen granules are also observed in these areas.

The muscle cell membrane is folded into finger-like extensions and invaginations that extend the surface of interaction between muscle cell and myoseptum (figure 2 B, D). These invaginations of sarcolemma are not observed in some myoseptal regions where the membrane is almost linear (figure 2 C). The morphology of the interface between the sarcolemma and the myosepta looks like an adhesive joint corresponding to dense material observed in the muscle cell membrane.

The lamina lucida and lamina densa form a thick differentiated basement membrane which separates muscle cells from upper region of the myoseptal stroma. At 48 hpf, myoseptum is 150 to 300 nm thick. It enlarges near dermis and notochord forming triangular regions in which fibroblast-like cells are observed. The myoseptal stroma presents features that are very similar to shape described at 24 hpf. Collagens fibrils are thin (about 30 nm of diameter). Longitudinal and transversal collagen fibrils are observed without particular orientation. In the same way, no particular orientation between collagen fibrils and myofibrils can be distinguished. No interaction between fibrils and basement membrane can be observed.



**Figure 1: morphology analysis of 24hpf myotendinous junction.** (A) longitudinal semi-thin section of tail of 24hpf embryo. TEM observation of myoseptal tendon (arrow). The myoseptum um origin takes place in triangular structure (asterisk) forms at the junction between the two neighboring myotomes and the epidermis. (B) 24hpf myoseptum structure is relatively low electron dense with a small amount of fibrillar material. The first sarcomeric actin microfilaments polymerize towards the plasma membrane. (C) High magnification from the myotendinous junction, we observe that the basal lamina is being synthesized (arrow). Note that the JMT is relatively linear. (D) Focus on the triangular structure (asterisk), this area seems acellular and contains a sparse network of collagen fibers.



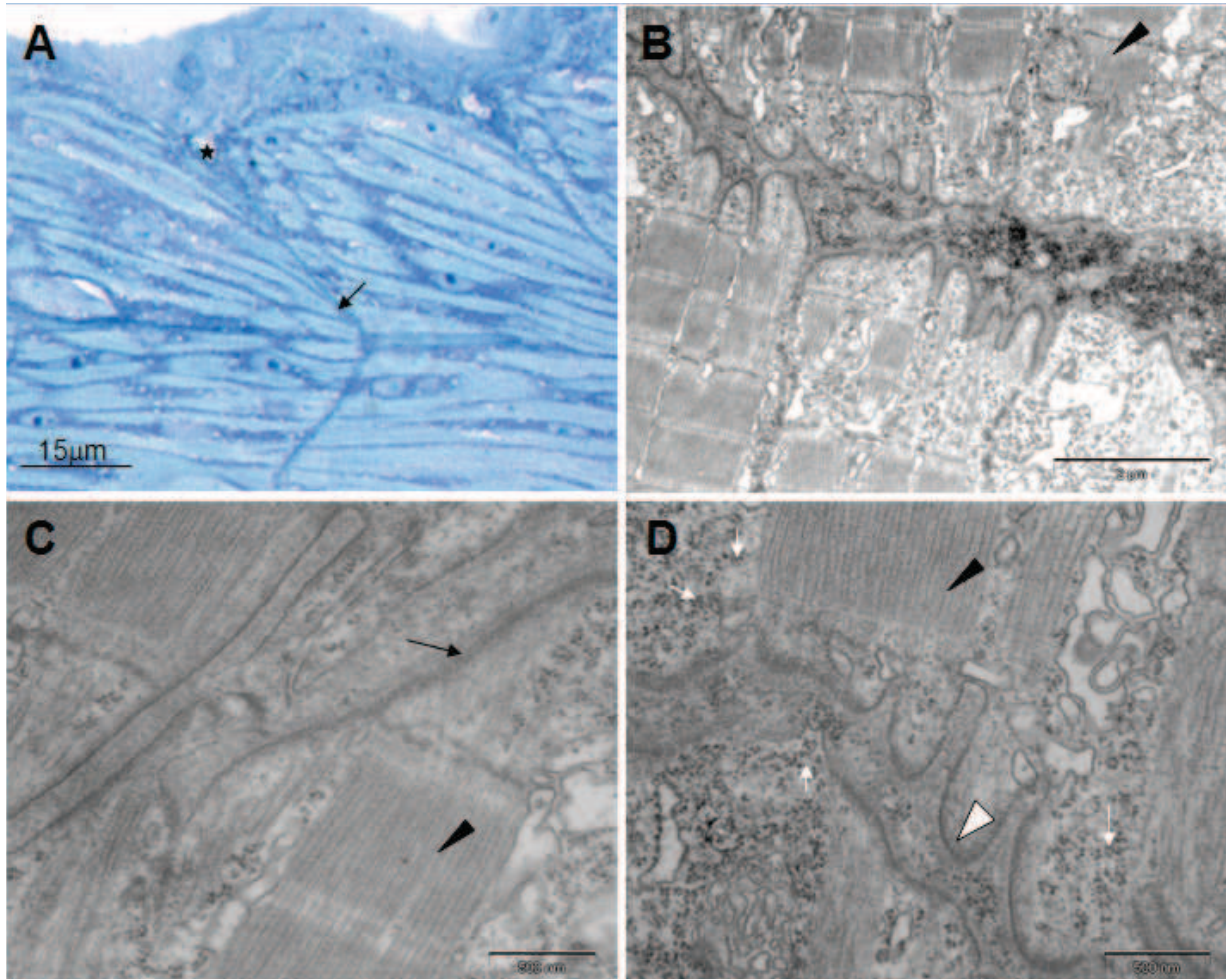
At 72 hpf, myofibrils are dense and a high number of polysome is found between the last Z-line and the sarcolemma. Granular endoplasmic reticulum is also observed. A thick basal lamina separates muscle cells and myosepta. The architecture of myosepta is similar to the previous stages (figure 3 B). At this stage of development the particular features are the enlargement of myoseptum up to 500 nm, the increase in collagen fibril number, and the presence of cell processes (figure 3 B). Sarcolemma is deeply invaginated. Myosepta consist of a high density of longitudinal and transversal collagen fibrils, which do not show particular arrangement (figure 3 C). Cell processes observed in myosepta derived from cells located in the triangular areas (figure 3 D). The presence of dilated granular endoplasmic reticulum is the expression of active ECM protein synthesis.

At 6 dpf, a remarkable change in the organisation of the primary myoseptal stroma has occurred. Indeed, the collagen fibrils have changed their spacing, orientation and organisation. From a loose primary myoseptal stroma composed of irregularly-spaced and randomly organized fibrils, it has now turned into a dense, regularly spaced network of collagen fibrils. In some regions, the fibrils are organised into two or three layers that show an orthogonal orientation with respect to each other (figure 4 D). Every layer of the plywood structure is composed by one norw

of collagen fibrils (figure 4 D). This orthogonal arrangement of collagen fibrils is not observed throughout the myoseptal thickness. The fibril diameter (around 30 nm) remains unchanged. Another remarkable feature is the presence of fibroblast-like cells between collagen fibrils (figure 4 C). These cells are flat and elongated. They contain large granular endoplasmic

reticulum that attests for cell activity.

At 2 months, the remarkable change is the new organisation of collagen fibrils in myosepta, that is now about 3  $\mu\text{m}$  thick. At this stage, an evident link can be observed between both muscle cells that are separated by myoseptum, and fibroblasts (figure 5 C, D). The link is built by collagen fibrils that show a particular orientation in the attachment regions of myofibrils on sarcolemma (figure 5 B). Collagen fibrils are anchored in the basement membrane and are parallel to myofilaments with which they seem to be in continuity. Toward the collagen fibril anchorages, the basement membrane is thicker and the sarcolemma is highly electron-dense can attach, in the same area, the other extremity of collagen fibrils can be anchored to the cell membrane of fibroblasts. The same collagen fibril arrangement is observed at both edges of fibroblast. Then, this ECM organisation forms an integrate unit that transduces force to the skeletal system and stabilizes myosepta.



**Figure 2: morphology analysis of 48hpf myotendinous junction.** (A) Longitudinal semi-thin section of a 48hpf fish tail in the extension yolk zone. The myoseptum (arrow) present a V shape. (B) At this stage, TEM observations show that sarcomers (black arrowhead) and basal lamina (black arrow) are totally differentiated (arrowhead) and that myoseptal matrix is much denser. Actin microfilaments from the last Z band anchor the sarcolemma (C) and invaginations of the sarcolemma are formed at these sites (D). At this point, there is a strong densification of the sub-sarcolemmal zone indicating an intense recruitment of proteins at the membrane (white arrowhead). Many polysomes (white arrows) are observed between the thin filament bundles, indicating of active protein synthesis.

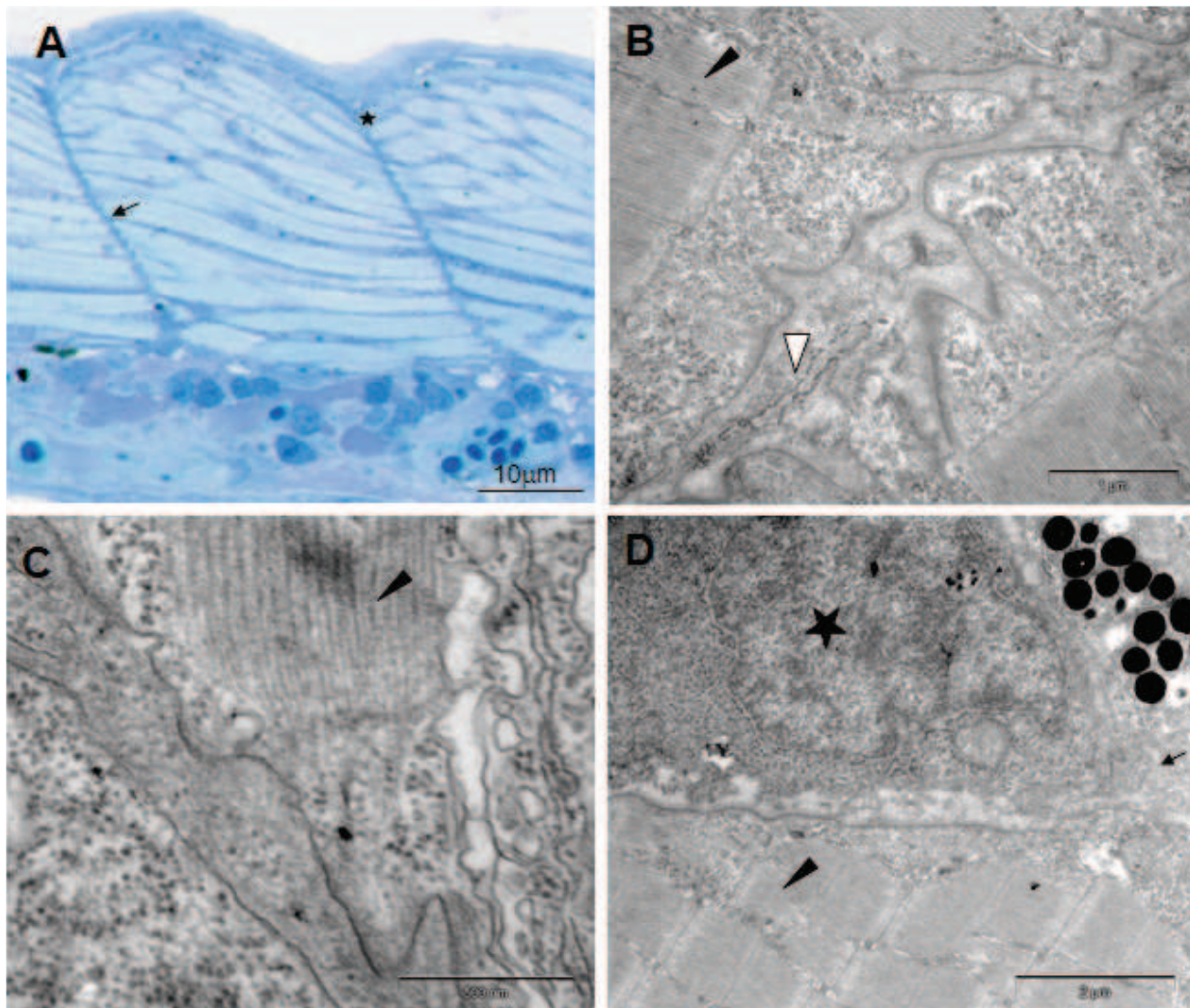
The myosepta observed in 2 years old zebrafish show a dense ECM composed of about 50 nm collagen fibrils that display an orthogonal orientation (figure 5 E). As in the previous stage, collagen fibrils are firmly anchored to the thick basement membrane. Sarcolemma shows regular invaginations at the interaction sites with myofilaments. The actin microfilaments are anchored into the hollows of invaginations and form the characteristic interdigitation of MTJ (figure 5 E).

### Discussion

In this paper, we described the development sequences of myosepta at the electron microscope level. In zebrafish, the development of myosepta starts concomitantly with the elongation and attachment of muscle cells. The first myoseptal matrix starts to be deposited before the end of segmentation period (data not shown). Together with the first deposited matrix, the first elements of the basement membrane line immature muscle cells. From this initial stage onwards, the following morphological changes have been identified in myosepta. During the first 6 days of development, collagen fibrils do not show any particular orientation and the myoseptal matrix is acellular. From the 6<sup>th</sup> day of development, or some time before, the typical orthogonal arrangement (plywood-like) organisation of the matrix appears, first near the basement membrane,

then throughout the whole myoseptal matrix. Ordered arrays of collagen fibrils have been reported to occur in teleost skin (Le Guellec *et al.*, 2004), in bone (Ascenzi and Bonucci, 1968), fish scale (Sire, 1987), chick tendon (Birk and Trelstad, 1986) and cornea (Trelstad and Coulombre, 1971). The mechanism of three-dimensional assembly of collagen molecules is unknown (for review, see Ploetz *et al.*, 1991). Physicochemical forces are sufficient to lead to a self-assembly of collagen fibrils as reported in several *in vitro* studies (Giraud-Guille *et al.*, 2000), but cells that produce ECM can regulate the process of fibrils formation by modification of the spatial and temporal matrix deposition (Holmes *et al.*, 2011, Forgacs *et al.*, 2003). In zebrafish, we have previously showed that orthogonal arrangement starts in the upper layer of primary dermal stroma that is acellular until 26 dpf. Then, the hypothesis is that epidermal basal cells, are responsible for ECM production and can regulate fibril assembly. In the myoseptal stroma, the orthogonal arrangement of collagen fibrils is concomitant with the invasion of the primary dermal stroma by fibroblasts. This suggests that fibroblasts are responsible for the myoseptal plywood organisation. It is noteworthy that, as in zebrafish skin, the first sheets of the plywood structure are composed by one line of collagen fibrils. Later in development, the fibrils are grouped as bundles that are organised into orthogonal



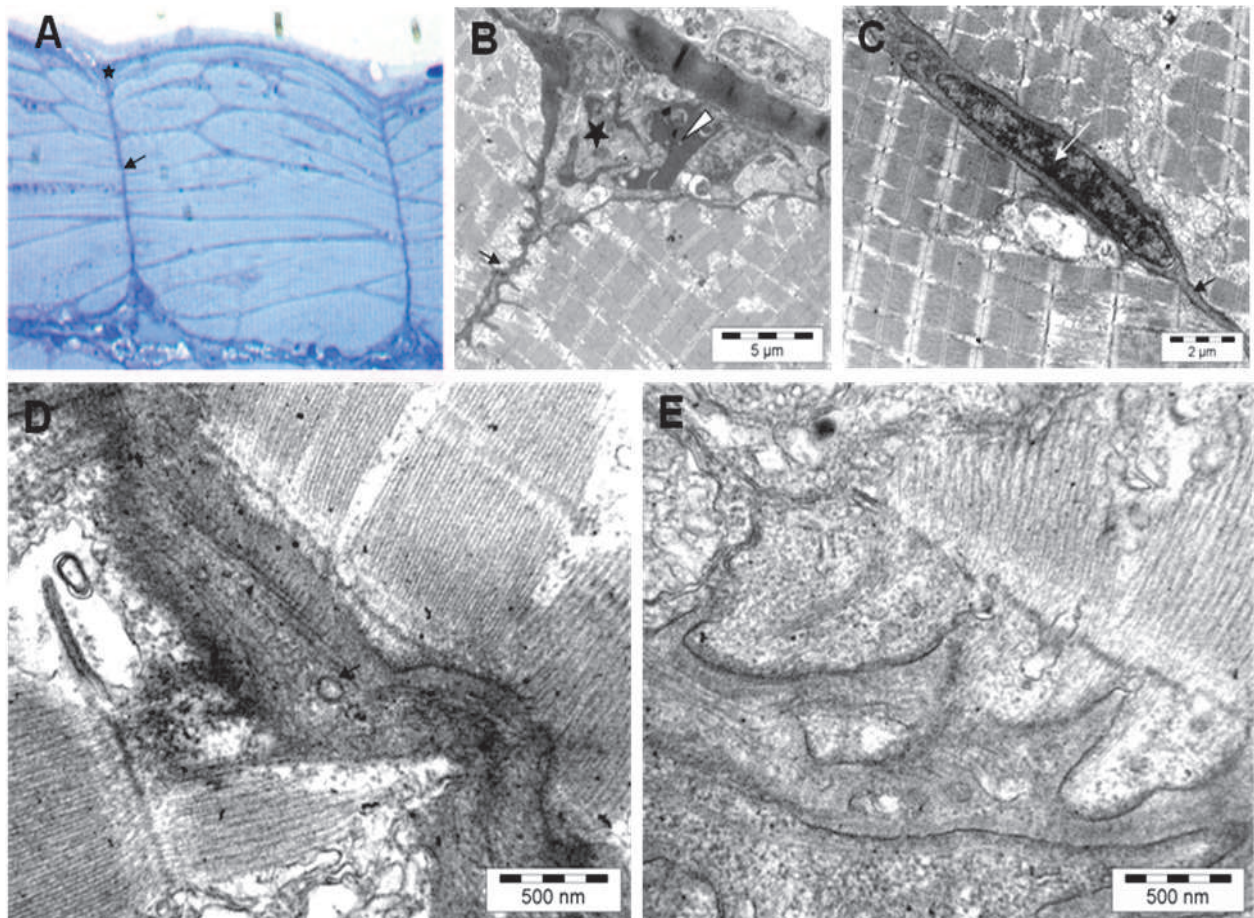


**Figure 3: morphology analysis of 72hpf myotendinous junction.** (A) Semi-thin longitudinal section of a fish tail. (B) TEM observation shown cell projection of fibroblast-like cells, that colonize the triangular structures (white arrowhead). (C) the myoseptal matrix structure and the MTJ appear similar to the previous stage (48hpf). (D) Triangular structures colonized by fibroblast-like cells.

array. In corneal stroma, the orthogonal arrangement of collagen fibrils is required for optical transparency of this tissue. In the same way, this arrangement provides skin transparency in fishes. In myosepta this specific array likely increases the myoseptal mechanical resistance to the contractile forces and likely more adapted to high-speed undulatory locomotion. The first collagen bundle next to muscle cells is strongly anchored to the sarcolemma through direct or indirect interactions with transmembrane protein complex that extend from the last Z-line. These strong interaction sites lead to the formation of sarcolemma interdigitations. Consequently, this solid link between contractile apparatus and collagen allows to transmission of muscle contractile forces. We have shown that muscle is attaches to the myoseptum either perpendicularly or with an obtuse angle that is appropriate to force transmission. This indicates that the mechanical work causes a displacement or deformation of the structure to which the myoseptal tendon is attached. It is noteworthy that the diameter of collagen fibrils remains constant during at least 2 first month (about 30 nm), indicating that fibril growth is stabilised. The regulation of the fibril diameter can involved multiple factors such as the degree of collagen glycosylation, procollagen processing, collagen/proteoglycan interaction and collagen I/V interactions (Kadler *et al.*, 2008). The increase of collagen fibre diameter occurs after 2 months, so much

later than in skin in which change in diameter is visible from 1 month of development (Le Guellec *et al.*, 2004). This suggests that the regulation of the collagen fibrils diameter and the composition of ECM are different in myosepta compared to skin. The knowledge on the composition of ECM in myosepta is still rudimentary. Collagen I, laminin, and tenascin have been detected in transverse myosepta (Dubois *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 1998). Collagen I is probably the major collagen in myosepta. Other collagen types have been detected in the somite boundaries, such as collagens XII (Bader *et al.*, 2009). Zebrafish myoseptal region certainly concentrates a number of other collagen types. Fibronectin is highly concentrated at somite boundaries (Crawford *et al.*, 2003, Snow *et al.*, 2009) during somite formation and is down-regulated concomitantly with slow-twitch fibre migration whereas laminin level remains constant (Snow *et al.*, 2009). This suggests that the composition of the microenvironnement of muscle cells, especially myosepta, is modulated during myogenesis. Periostin, an ECM protein expressed in periosteum and periodontal ligament tissues in mammals (Horici *et al.*, 1999), is expressed in myoseptum during the segmentation period. Morpholino knock down of the periostin showed that periostin secretion in myoseptum is required for the attachment of muscle fibre bundle to myoseptum and the differentiation of muscle fibres (Kudo *et al.*, 2004). From the 6<sup>th</sup> day



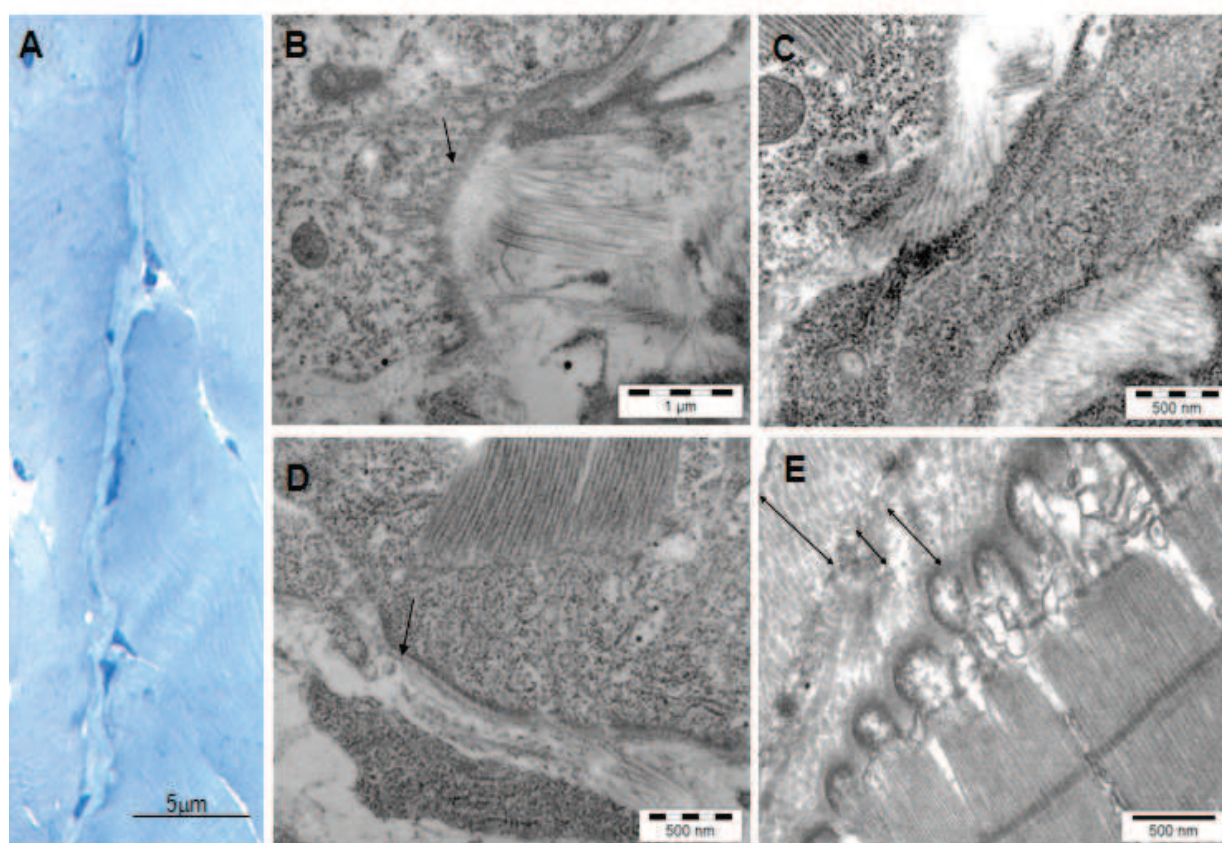


**Figure 4: morphology analysis of 6dpf myotendinous junction.** (A) Semi-thin longitudinal section of a 6dpf fish tail. The myosepta (arrow) and the triangular structure (asterisk) are larger than in the previous stage. (B) TEM observation shows a complex organization of triangle area (asterisk). Note the presence of fibroblast-like cells and blood vessels (white arrowhead). (C) From 6dpf, fibroblasts-like cells (white arrowhead) are found in the myoseptal structure. The thin actin microfilaments from the last Z band bind in the same line (D) or indirectly obliquely (E) to the myoseptal fibrillar collagen network. (D-E) The myoseptal matrix network organization is different than earlier stages. Indeed, the collagen fibrils appear more regularly spaced and oriented into two different axes.

of development, we observed that collagen fibres are regularly spaced. We can speculate that molecules such as proteoglycans or tensilin (Tipper *et al.*, 2002; Tamori *et al.*, 2006) fill the empty spaces between collagen fibres, and play significant functional roles in transferring stress between adjacent fibrils.

The matrix remains acellular during the first 4-6 days of development. At day 6, the matrix is invaded by fibroblasts. The strmal origin of these cells is unclear. The hypothesis is that they are derived from the

cells located in the triangular regions where myosepta and skin are interconnected (figure 4 B, C). The fact that myosepta are acellular during the initial stages of development raises the question of the origin of the myoseptal matrix. Two different types of cells can deposit extracellular components, muscle cells and cells located in the triangular regions, which extend cell processes in myosepta. We can speculate that ECM proteins are synthesized in cell bodies located in the triangular region,



**Figure 5: morphology analysis of myotendinous junction of 2 month and 2 year fish.** (A) Semi-thin longitudinal section of a 2 year fish tail in the extension yolk zone. (B) Observation of an evident junctional link (black arrow) between muscle cell cytoskeleton and collagen fibers providing a perfect in-line orientation of actin microfilaments and matrix fibers of 2mpf embryo. (D) The basement membrane is thicker and the sub-sarcolemmal zone is highly dense to electron. (C-D) The fiber seems to be anchored to the fibroblast-like plasma membrane. (E) The collagen fiber diameter growth to 50nm and the fibers are clearly organized in a succession, of orthogonal layers (double arrows). The MTJ is a repetition of regular deep invaginations of sarcolemma. Note that the actin microfilaments are anchored in the hollows of invaginations.



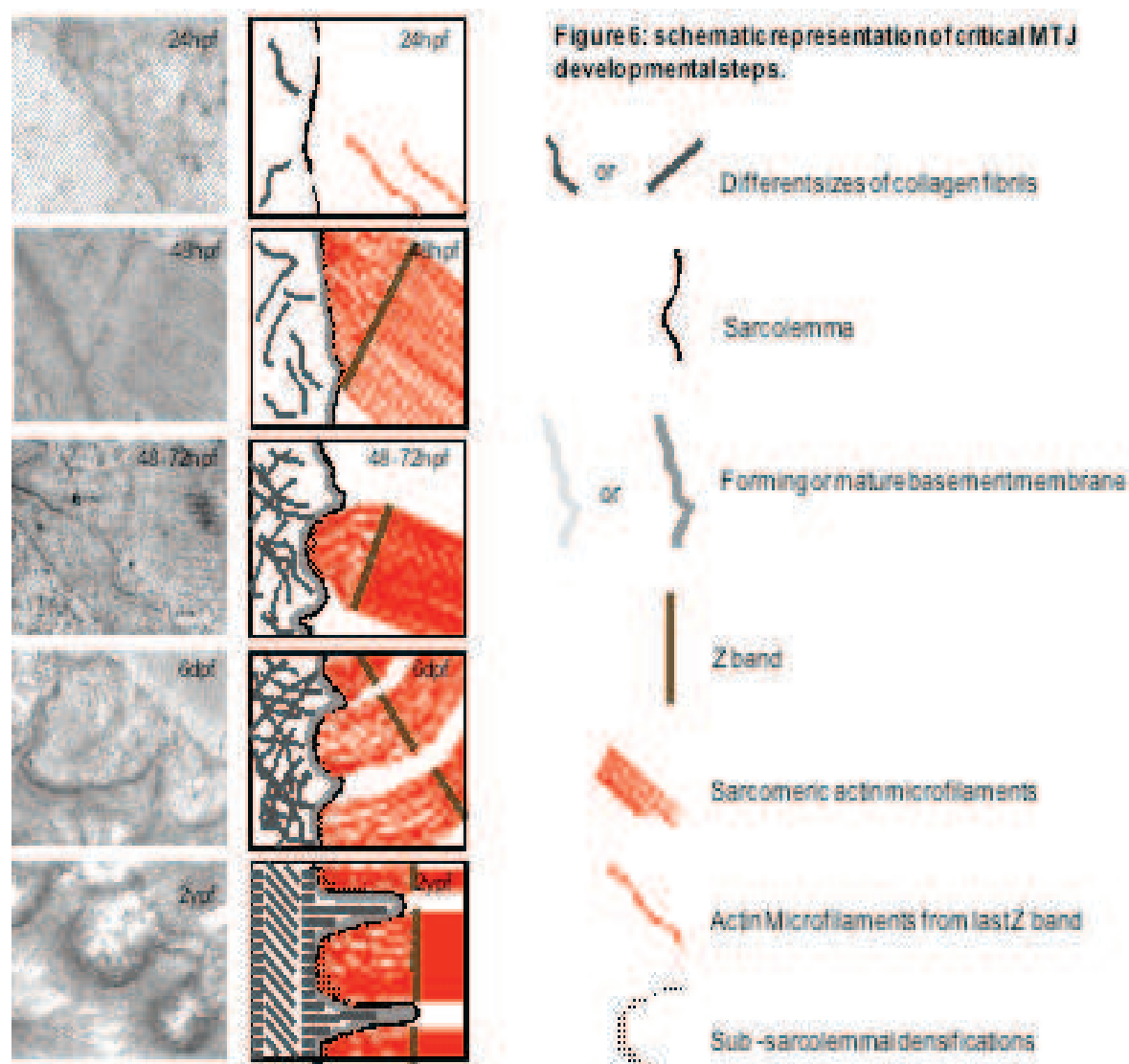
transported *via* the cytoplasmic processes, and secreted in the extracellular space. On the

other hand, muscle cells are able to synthesize ECM proteins which are deposited at the MTJ. For example, it has been shown that periostin (Kudo *et al.*, 2004) and *Col22a1* (Charvet *et al.*, submitted) were expressed in developing muscle cells.

In conclusion, the important steps of the transverse myoseptum development leading to the formation of a functional myotendinous junction can be summarized as follows :

- 1- During the segmentation period, concomitantly with the myofibrillogenesis, the components of ECM are deposited in the future myosepta formed by sparsely, loosely organized collagen fibrils. ECM and muscle cells are separated by a discontinuous basal lamina (figure 1 C).
- 2- During the hatching period, actin filaments of the last Z-line link to sarcolemma. A dense and uninterrupted basal lamina is now well differentiated and collagen fibrils are more abundant in acellular myosepta (figure 2 D). At this stage the MTJ is not fully differentiated and looks fragile.
- 3- A functional MTJ is formed following the orthogonal

arrangement of collagen fibres, the solid direct or indirect interactions between collagen fibres and sarcolemma proteins, including the dystroglycan complex, which interacts with actin myofilaments (figure 3 D, E). Then, the two MTJ that delimit each myoseptum coordinate mechanical force between adjacent muscle cells. A number of questions, mainly those concerning the origin of myoseptal fibroblasts, however, remains unanswered. However, this work is the first atlas of myotendinous development. The use of zebrafish in the muscular disease studies makes this atlas a useful tool for phenotypic analysis of fish presents who presents dystrophic phenotype.



## References:

- Ascenzi A, Bonicci E (1968)** The compressive properties of single osteons as a problem of molecular biology. *Calcif. Tissue Res. Suppl.* 44-44a.
- Bader HL, Keene DR, Charvet B, Veit G, Driever W, Koch M, Ruggiero F (2009)** Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (*fascia*) and basement membranes. *Matrix Biol.* 28, 32-43.
- Birk D, Trelstad RL (1986)** Extracellular compartments in tendon morphogenesis: collagen fibril, bundle, and macroaggregate formation. *J. Cell Biol.* 103(1), 231-240.
- Crawford BD, Henry CA, Clason TA, Becker AL, Hille MB (2003)** Activity and distribution of paxillin, focal adhesion kinase, and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 14(8), 3065-3081.
- Dubois GM, Haftek Z, Crozet C, Garrone R, Le Guellec D (2002)** Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for alpha2 type I collagen of zebrafish. *Gene.* 294(1-2), 55-65.
- Giraud-Guille MM, Besseau L, Chopin C, Durant P, Herbage D (2000)** Structural aspects of fish skin which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterials.* 21(9), 899-906.
- Guyon R, Mosley An, Zhou Y, O'Brien KF, Sheng X, Chiang K, Davidson AJ, Volinski JM, Zon LI, Kunkel LM (2003)** The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* 12 (6), 601-615.
- Holmes DF, Gilpin CJ, Baldock C, Ziese U, Koster AJ, Kadler KE (2001)** Corneal collagen fibril structure in three dimensions: structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(13), 7307-7312.
- Kadler KE, Hill A, Canty-Laird (2008)** Collagen fibrillogenesis: fibronectin, int  grins and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 20, 495-501.
- Kudo H, Amizuka N, Araki K, Inohaya K, Kudo A (2004)** Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev. Biol.* 267(2), 473-87.
- Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Sire JY (2004)** Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2-3), 217-231.
- Parsons MJ, Campos I, Hirst EM, Stemple DL (2002)** Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development.* 129(14), 3505-3512.
- Ploetz C, Zychband EI, Birk DE (1991)** Collagen fibril assembly and deposition in the developing dermis: segmental deposition in extracellular compartment. *J. Struct. Biol.* 106(1), 73-81.
- Sire JY, G  raudie J, Meunier FJ, Zylberberg L (1987)** On the origin of ganoine : histological and ultrastructural and ultrastructural data on the experimental regeneration of the scales of *Calamoichthys calabaricus* (*Osteichthyes, Brachyopterygii, Polypteridea*). *Am. J. Anat.* 180(4), 391-402.
- Snow CJ, Henry CA (2009)** Dynamic formation of microenvironments at the myotendinous junction correlates with muscle fiber morphogenesis in zebrafish. *Gene Expr. Patterns.* 9(1), 37-42.
- Tamori M, Yamada A, Nishida N, Motobayashi Y, Oiwa K, Motokawa T (2006)** Tensilin-like stiffening protein from *Holothuria leucospilota* does not induce the stiffest state of catch connective tissue. *J. Exp. Biol.* 209, 1594-1602.
- Tipper JP, Lyons-Levy G, Atkinson MA, Trotter JA (2002)** Purification, characterization and cloning of tensilin, the collagen-fibril binding and tissue-stiffening factor from *Cucumaria frondosa* dermis. *Matrix Biol.* 21 (8), 625-635.
- Trelstad RL, Coulombre AJ (1971)** Morphogenesis of the collagenous stroma in chick cornea. *J. Cell. Biol.* 50(3), 840-858.



**Weber P, Montag D, Schachner M, Bernhardt  
RR (1998)** Zebrafish tenascin-W, a new member of

the tenascin family. *J. Neurobiol.* 35(1), 1-16.

## Publication II :

**Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths  
(fascia) and basement membranes**

Hannah L. Bader, Douglas R. Keene, Benjamin Charvet, Guido Veit, Wolfgang Driever, Manuel Koch, Florence Ruggiero

*Matrix Biology*



# Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes

Hannah L. Bader<sup>a,b,c</sup>, Douglas R. Keene<sup>d,e</sup>, Benjamin Charvet<sup>a,b</sup>, Guido Veit<sup>c</sup>, Wolfgang Driever<sup>f</sup>, Manuel Koch<sup>c</sup>, Florence Ruggiero<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, France

<sup>b</sup> CNRS, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086; IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France

<sup>c</sup> Center for Biochemistry and Department for Dermatology, Medical Faculty, University of Cologne, Joseph-Stelzmann Strasse 52, 50931 Cologne, Germany

<sup>d</sup> Micro-Imaging Center, Shriners Hospital for Children, 3101 S. W. Sam Jackson Park Road, Portland, Oregon 97239, USA

<sup>e</sup> Department of Molecular and Medical Genetics, Oregon Health Science University, Portland, Oregon, USA

<sup>f</sup> Department of Developmental Biology, Institute Biology 1, University of Freiburg, Hauptstr.1, 79104 Freiburg, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 March 2008

Received in revised form 17 September 2008

Accepted 17 September 2008

### Keywords:

Col12a1

FACIT

Extracellular matrix

Basement membrane

Laminin

Floor plate

## ABSTRACT

Connective tissues ensure the cohesion of the tissues of the body, but also form specialized structures such as tendon and bone. Collagen XII may enhance the stability of connective tissues by bridging collagen fibrils, but its function is still unclear. Here, we used the zebrafish model to visualize its expression pattern in the whole organism. The zebrafish *col12a1* gene is homologous to the small isoform of the tetrapod *col12a1* gene. In agreement with the biochemical data reported for the small isoform, the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain was characterized as a collagenase sensitive band migrating at ~200 kDa. Using newly generated polyclonal antibodies and anti-sense probes, we performed a comprehensive analysis of its expression in developing zebrafish. Collagen XII exhibited a much broader expression pattern than previously thought: it was ubiquitously expressed in the connective tissue sheaths (fascia) that encase the tissues and organs of the body. For example, it was found in sclera, meninges, epimysia and horizontal and vertical myosepta. Collagen XII was also detected in head mesenchyme, pharyngeal arches and within the spinal cord, where it was first expressed within and then at the lateral borders of the floor plate and at the dorsal midline. Furthermore, double immunofluorescence staining with laminin and immunogold electron microscopy revealed that collagen XII is associated with basement membranes. These data suggest that collagen XII is implicated in tissue cohesion by stabilizing fascia and by linking fascia to basement membranes.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Connective tissues consist predominantly of extracellular matrix (ECM) which is produced by interspersed cells such as fibroblasts. The most abundant ECM proteins in connective tissues are collagens, which are made up of three polypeptide chains referred to as  $\alpha$  chains. The  $\alpha$  chains are intertwined into a tight rod-like triple helix, thereby forming a unique protein domain, the collagenous domain. The  $\alpha$  chains contain repeats of Gly-X-Y triplets, in which X and Y are frequently proline and hydroxyproline residues, respectively. This sequence is strictly required for the correct formation of the triple helix since only the glycyl residue can fit into the center of the helix and the imino-acid residues are essential for triple helix folding and stabiliza-

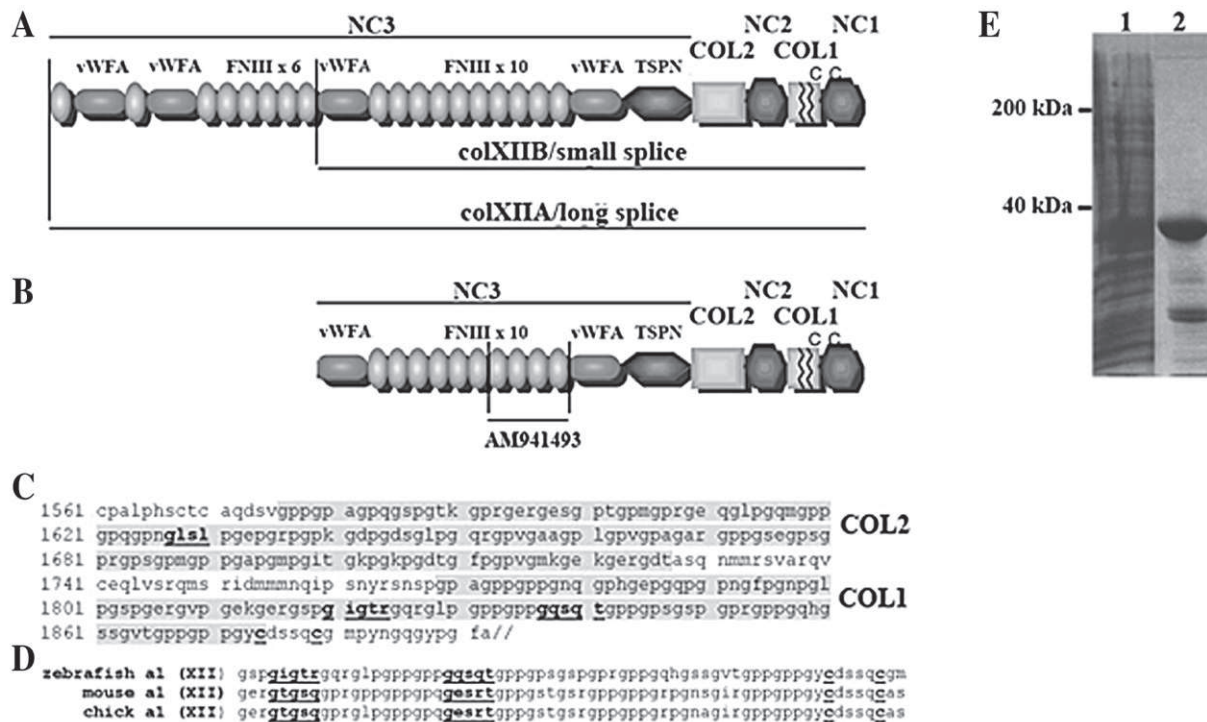
tion. To date, 28 different collagens have been identified that show great structural diversity both at the level of the  $\alpha$  chains and at the level of the supramolecular aggregates that they form (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). A great number of devastating hereditary diseases caused by mutations in collagen genes have revealed that collagens are essential for the biomechanical properties of diverse tissues (Myllyharju and Kivirikko, 2004). However, it is becoming increasingly evident that collagens are not just structural proteins and that they are also involved in signaling processes (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005).

Collagen XII belongs to a subset of collagens called Fibrillar-Associated Collagens with Interrupted Triple helices (FACITs). FACITs do not form supramolecular aggregates by themselves, but are generally associated to the striated fibrils formed by fibrillar collagens, which are a major component of connective tissues. The formation of striated fibrils is tightly regulated, since variations in their composition, diameter and three dimensional arrangement result in different biomechanical and biological properties of the connective tissues. FACITs are thought to regulate fibril growth, spacing and diameter, and also to link fibrils to other proteins of the ECM (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005).

**Abbreviations:** ECM, extracellular matrix; BM, basement membrane; hpf, hours post-fertilization; dpf, days post-fertilization.

\* Corresponding author. Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR5086 7, passage du Vercors, 69367 Lyon, Cedex 07, France. Tel.: +33 472 722 657; fax: +33 472 722 602.

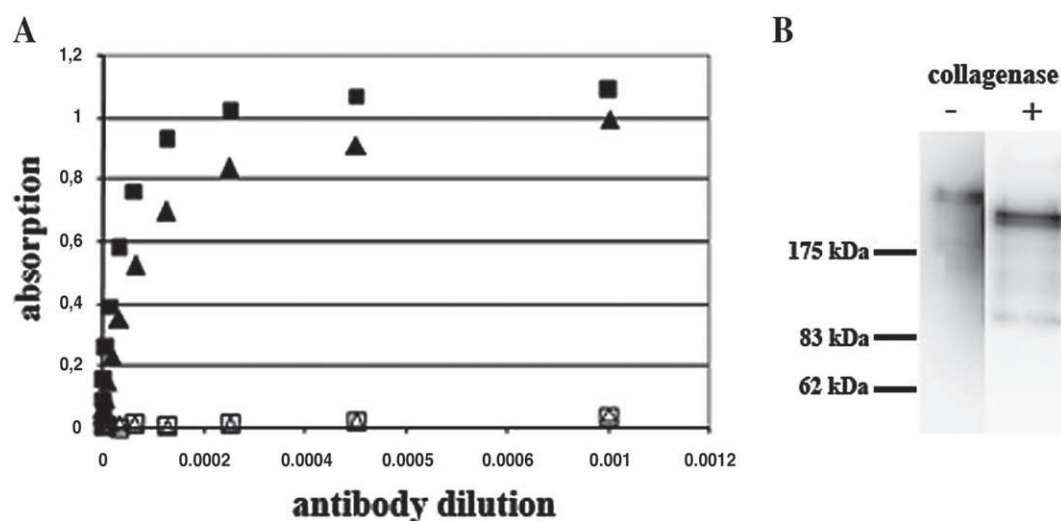
E-mail address: [f.ruggiero@ibcp.fr](mailto:f.ruggiero@ibcp.fr) (F. Ruggiero).



**Fig. 1.** Structure of the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain. A–B: Schematic representation of the collagen XII  $\alpha 1$  chain of tetrapods (A) and zebrafish (B), showing that the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain is an ortholog of the small isoform. Long and small isoforms are indicated in A. The location of the sequence cloned for the preparation of the fusion protein and the anti-sense probes (AM941493) is indicated in B. C: Predicted amino acid sequence of the C-terminus of the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain (XP\_683613), showing the features of a FACIT. Collagenous domains are shaded. D: alignment of the NC1–COL1 junction of the zebrafish (XP\_683613), mouse (Q60847) and chick (P13944) collagen XII amino acid sequences. The chains were aligned at the CXXXXC motif. The CXXXXC motif and the imperfections of the triple helix are bold and underlined. NC1, NC2, NC3: non collagenous domains; COL1, COL2: collagenous domains; TSPN: Thrombospondin N-terminal domain; vWFA: von Willebrand Factor A domain; FNIII: Fibronectin type III domain; C indicates the position of the cysteines in the conserved CXXXXC motif and zigzag lines indicate imperfections of the triple helix domain. E: SDS–PAGE showing the recombinantly expressed fusion protein, which has a molecular weight of approximately 40kDa, in extract from induced bacteria (1) and after affinity purification (2).

The function of collagen XII is not yet well understood. The collagen XII  $\alpha 1$  chain, which is made up of three non collagenous domains (NC1, NC2, NC3) alternating with two collagenous domains (COL1, COL2), forms a homotrimer. The NC3 domains, which are very large and consist of multiple non collagenous domains, fold into three arms which are extended from a stem formed by two short collagenous domains. For the mammalian and avian collagen  $\alpha 1$  chain, a long and a

short splice variant – called collagen XIIA and XIIB, respectively – have been described, which differ by about 100kDa in the length of the NC3 domain (Ricard-Blum et al., 2000). The two isoforms are often coexpressed, but expression of the long isoform is observed earlier than expression of the short isoform, and at later developmental stages, the long isoform has a more restricted expression pattern than the short isoform (Oh et al., 1993; Koch et al., 1995). Additional splice

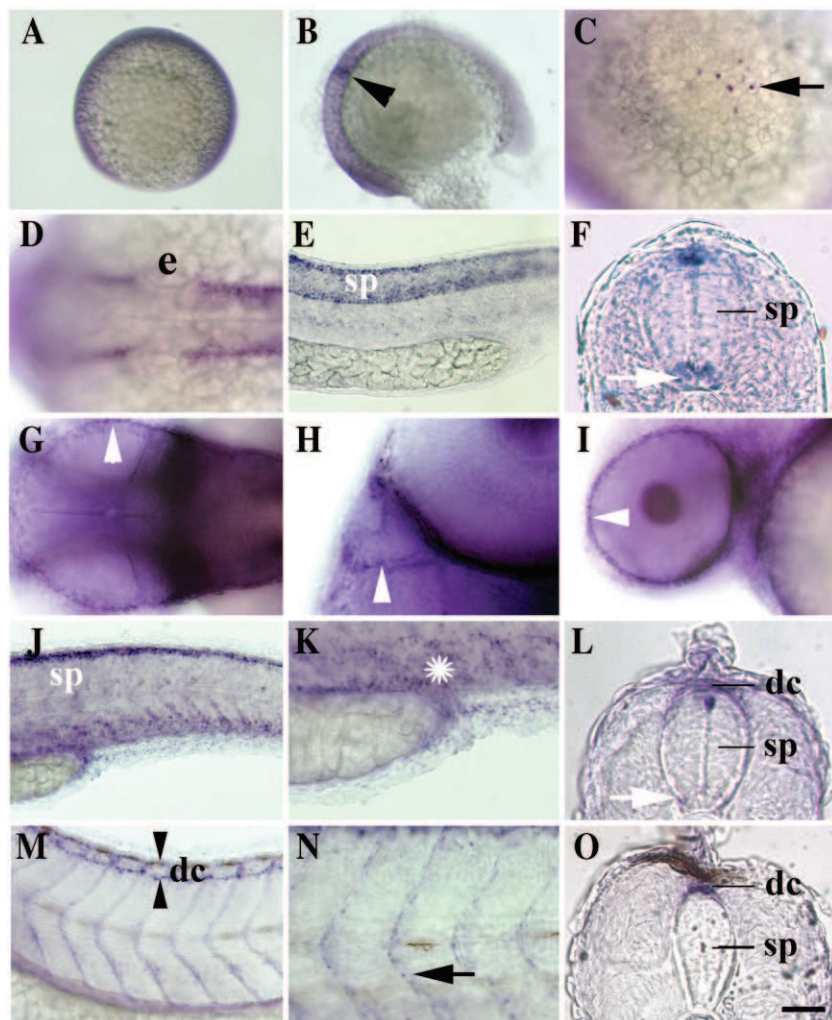


**Fig. 2.** Specificity of the polyclonal anti-zebrafish collagen XII antibodies. A: ELISA style assay. Affinity-purified rabbit (squares) and guinea pig (triangles) polyclonal antibodies directed against zebrafish collagen XII were probed for binding to a recombinant protein spanning several FNIII repeats of zebrafish collagen XII (full squares/triangles) or zebrafish collagen XIV (open squares/triangles). The diagram is representative of 3 independent experiments. B: The affinity purified rabbit anti-zebrafish collagen XII antibody was used to immunoprecipitate collagen XII from a protein extract from adult zebrafish. The immunoprecipitate treated with (+) or without (–) collagenase was analyzed by Western Blot using the affinity-purified guinea pig anti-zebrafish collagen XII antibody. Left and right lanes were exposed for different lengths of time.

variants have been described for the murine collagen XII  $\alpha 1$  chain (Kania et al., 1999). Collagen XII colocalizes widely with collagen I (Walchli et al., 1994), which is a fibrillar collagen present in all connective tissues except cartilage and vitreous. *In vivo*, collagen XII is found at the surface of striated fibrils (Keene et al., 1991) and *in vitro* assays have shown that it binds non-covalently to fibrils of collagen I (Koch et al., 1995; Font et al., 1996). The binding is mediated by the collagenous domains and may involve a bridging protein. The arm forming non collagenous domains are extended into the perifibrillar space and have been shown to bind to other ECM components such as small proteoglycans (Font et al., 1996) and tenascin X (Veit et al., 2006). Collagen XII and tenascin X may form molecular bridges between adjacent fibrils of collagen I, thereby rendering the ECM more resistant to mechanical stress. In support of an ECM reinforcing role, collagen XII is upregulated both *in vitro* and *in vivo* when mechanical stress is applied (Trachslin et al., 1990; Fluck et al., 2000). Hence, it is likely that collagen XII has a crucial role in maintaining the integrity of tissues that are exposed to mechanical stress, such as tendon. On the other hand, there is evidence that collagen XII enhances matrix deformability. *In vitro* data indicate that collagen XII enhances the fluidity of

collagen fibrils, presumably by reducing the friction between sliding fibrils (Nishiyama et al., 1994). Interestingly, analysis of knock-out mice and patients with Ehlers-Danlos Syndrome, which is characterized by hyperextensible skin and laxity of joints, has revealed that tenascin X is needed for correct collagen fibril deposition and spacing (Burch et al., 1997; Mao et al., 2002). The mechanism by which tenascin X acts on fibrillogenesis is still unknown and could involve collagen XII. Furthermore, collagen XII may be implicated in matrix reorganization events, in particular during development. In support of the latter, collagen XII has been shown to be strongly expressed in regenerating newt limb (Wei et al., 1995). Additional functions are conceivable, since collagen XII is a multi-domain protein, and since the function of many of its domains are still unknown.

Due to its small size and transparency, the zebrafish embryo is ideal to visualize the expression pattern of a protein in the whole organism. We took therefore advantage of this model to get a more comprehensive picture of collagen XII expression during development. Using both anti-sense probes and newly generated polyclonal antibodies, we have performed a detailed analysis of collagen XII expression in developing zebrafish up to 3dpf. Biochemical analysis



**Fig. 3.** Expression pattern of the *col12a1* transcript. A–L: Whole mount in situ hybridization with *col12a1* specific probes of embryos at the 10-somite stage (A), the 18-somite stage (B), 24hpf (C–F), 48hpf (G–L) and 72hpf (M–O). A–C, E, I, J–K, M–N: lateral views, anterior left, dorsal up; D, G: dorsal view of brain, anterior left; H: ventral view; F, L, O: transversal section of the tail at the level of the yolk sac extension, dorsal up; sections were made manually after performing whole mount in situ hybridization. The big black arrowhead points to expression in a band within the brain at the 18 somite stage (B) and black arrows point to punctuate expression in the skin of the yolk sac at 24hpf (C) and in the myosepta at 72hpf (N), respectively. White arrows indicate expression in the floor plate at 24hpf (F) and the lateral border of the floor plate at 48hpf (L). White arrowheads point to expression in meninges (G), the connective tissue sheath of the nasal pit (H) and the sclera (I), respectively and the asterix indicates punctuate expression at the level of the blood vessels and of the pronephric duct (K). Black double arrowheads (M) indicate the boundaries of the dorsal connective tissue at 72hpf. e, ear placode; sp, spinal cord; dc, dorsal connective tissue. Scale bar = 125  $\mu$ m (A), 100  $\mu$ m (B), 50  $\mu$ m (D, G, I–J, M); 25  $\mu$ m (C, H, K, N), 12.5  $\mu$ m (F, L, O).



showed that zebrafish collagen XII exhibits features similar to those reported for the mammalian and avian orthologs. Furthermore, we show that collagen XII expression starts during somitogenesis and that it is ubiquitously expressed in embryonic fascia, the connective tissue sheaths encasing the organs and tissues of the body. However, collagen XII expression was not restricted to connective tissues. We also observed expression in head mesenchyme and within the spinal cord. Double immunofluorescence staining revealed a striking colocalization with laminin, and immunogold electron microscopy confirmed that collagen XII does not only localize to connective tissues, but is also associated with basement membranes. These data suggest that collagen XII is not only needed for the integrity of tissues highly exposed to mechanical stress, such as tendon, but also for the cohesion of tissues throughout the body.

## 2. Results

### 2.1. Structure of the zebrafish collagen XII $\alpha 1$ chain

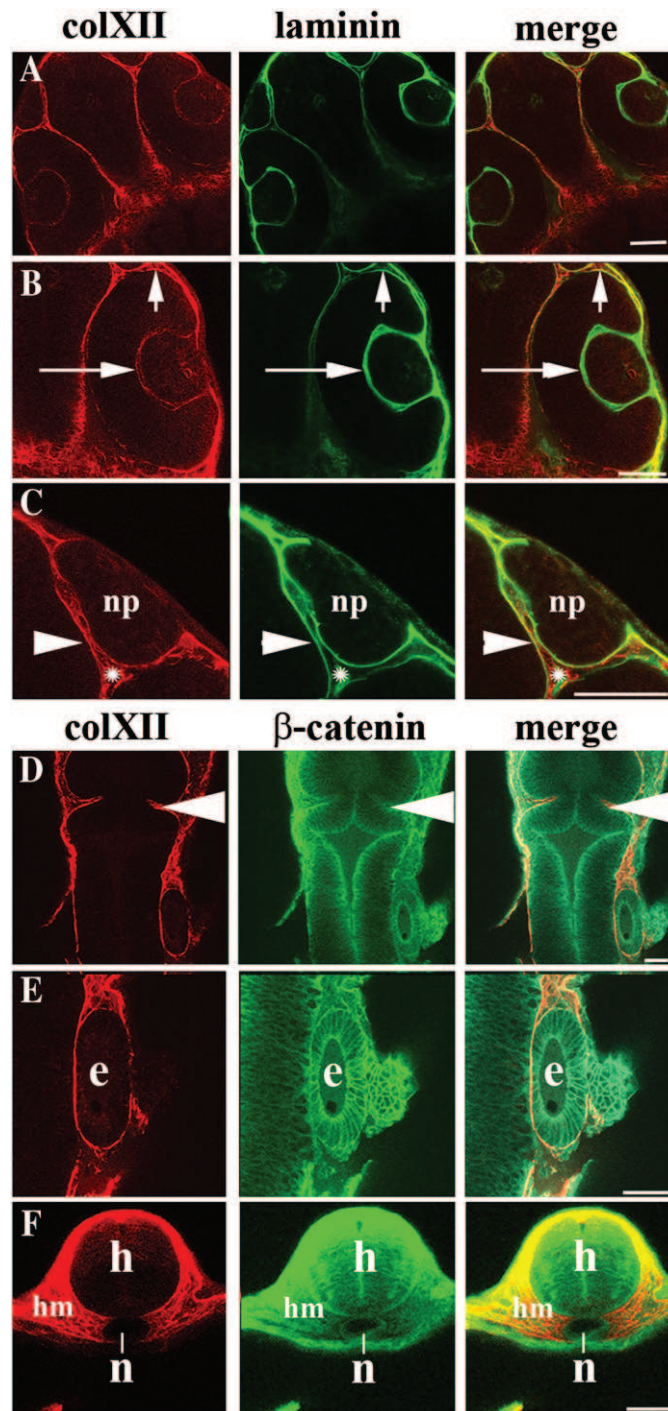
A zebrafish ortholog of the *col12a1* gene (Loc555878) is available in the CoreNucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). It is located on chromosome 17. Alignment of the predicted amino acid sequence of the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain (XP\_683613 – without signal peptide: aa 23–aa 1893) and the mouse collagen XII  $\alpha 1$  chain (Q60847 – small isoform: aa 1199–aa 2864) revealed 58% identity and 75% similarity, whereas an alignment with the mouse  $\alpha 1$  chain of the closely related collagen XIV (Q80X19 – without signal peptide: aa 29–aa 1797), showed only 41% identity and 60% similarity.

For the mammalian and avian collagen XII  $\alpha 1$  chain, a long and a small splice variant, called collagen XIIA and XIIB, respectively, have been described. In the long isoform, domains are added to the N-terminus of the third non collagenous domain, the NC3 domain (Fig. 1A) (Yamagata et al., 1991; Bohme et al., 1995; Gerecke et al., 1997). The two isoforms differ therefore by about 100kDa in molecular weight. The sequence of the zebrafish *col12a1* gene (Loc555878) currently available in the CoreNucleotide database lacks exons encoding a long isoform. Collagen XIIA may therefore not exist in zebrafish. However, for many tetrapod genes, teleosts have two co-orthologs (Postlethwait et al., 2004). It is therefore possible that a second zebrafish *col12a1* gene encoding a long isoform exists.

We have analyzed the domain organization of the predicted protein product (XP\_683613) of the zebrafish *col12a1* gene with the ScanProsite tool (ExPASy Proteomics Server) and found that its domain organization is identical to the domain organization of the small isoform of the tetrapod collagen XII  $\alpha 1$  chain (Fig. 1B). Two small collagenous domains, referred to as COL1 and COL2 respectively, alternate with three non collagenous regions, called NC1, NC2 and NC3. NC1 and NC2 are linker regions, whereas the NC3 domain is very large and subdivided into a succession of different domains: a Thrombospondin N-terminal (TSPN) domain, two von Willebrand factor A (vWFA) domains and 10 repeats of the fibronectin type III (FNIII) domain. Furthermore, the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain displays the features of a FACIT (Fig. 1C, D). Firstly, the COL1 domain has two imperfections in the GXY triplet repeats. Secondly, a conserved motif (CXXXXC) is found at the junction of the NC1 and COL1 domain. In addition, as described for the tetrapod collagen XII  $\alpha 1$  chain, the GXY repeats of the COL2 domain are also disrupted by an imperfection.

### 2.2. Preparation of polyclonal antibodies specific for zebrafish collagen XII and biochemical characterization of the zebrafish collagen XII $\alpha 1$ chain

ECM protein and transcript expression does not always coincide. To detect not only the transcript, but also the protein, we prepared polyclonal antibodies directed against the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$  chain. To this end, a partial sequence of the zebrafish collagen XII  $\alpha 1$



**Fig. 4.** Double immunofluorescence staining of the head of a 24hpf embryo with antibodies specific for collagen XII and laminin or  $\beta$ -catenin. Indirect whole mount immunofluorescence staining of 24hpf embryos, all images are confocal images. Rows A–C show a double immunofluorescence staining with antibodies specific for collagen XII and laminin. Each row shows collagen XII staining (red), laminin staining (green) and an overlay of both stainings (merge). Rows D–F show a double immunofluorescence staining with antibodies specific for collagen XII and  $\beta$ -catenin. Each row shows collagen XII staining (red),  $\beta$ -catenin staining (green) and an overlay of both stainings (merge). Row A–C show a dorsal view of the head, anterior up. Row B: higher magnification of eye, short and long arrows point to the sclera and the ECM surrounding the lens, respectively. Row C: higher magnification of the nasal pit (np), asterisk indicates connective tissue between meninges (small arrowhead), nasal pit and sclera. Row D: flat-mount of the head at the level of the midbrain-hindbrain boundary, anterior up. Large arrowheads indicate the midbrain-hindbrain boundary. Row E: higher magnification of row D focusing on the ear placode (e). Row F: transversal section of the hindbrain posterior to the ear placode, dorsal up. The section was made manually after staining. h, hindbrain; hm, head mesenchyme; n, notochord. Scale bars correspond to 50  $\mu$ m.



chain was cloned (AM941493) and used for the preparation of a recombinant fusion protein. The sequence spans four fibronectin type III repeats and is located at the C-terminus of the NC3 domain (Fig. 1B). The fusion protein was affinity purified (Fig. 1E) and used for immunization. Western blot with an anti-HIS-tag antibody showed that the doublet <40 kDa, which is not removed by purification, is a degradation product of the fusion protein (data not shown). Using an ELISA style assay, we showed that our antibodies recognized the recombinant protein used for immunization, but did not cross-react with a recombinant protein spanning several FNIII repeats from the zebrafish  $\alpha 1$  chain of the closely related collagen XIV (Fig. 2A). For the guinea pig antibody, a preincubation assay was performed, which demonstrated that it did not cross react with any other ECM protein, either. Hence, the signal obtained by immunofluorescence staining was completely suppressed by preincubating the antibody with the recombinant domain of the collagen XII  $\alpha 1$  chain. Conversely, preincubation of the antibody with the recombinant domain of the collagen XIV  $\alpha 1$  chain did not affect the staining (data not shown). In addition, the rabbit and guinea pig antibodies showed identical staining patterns (data not shown).

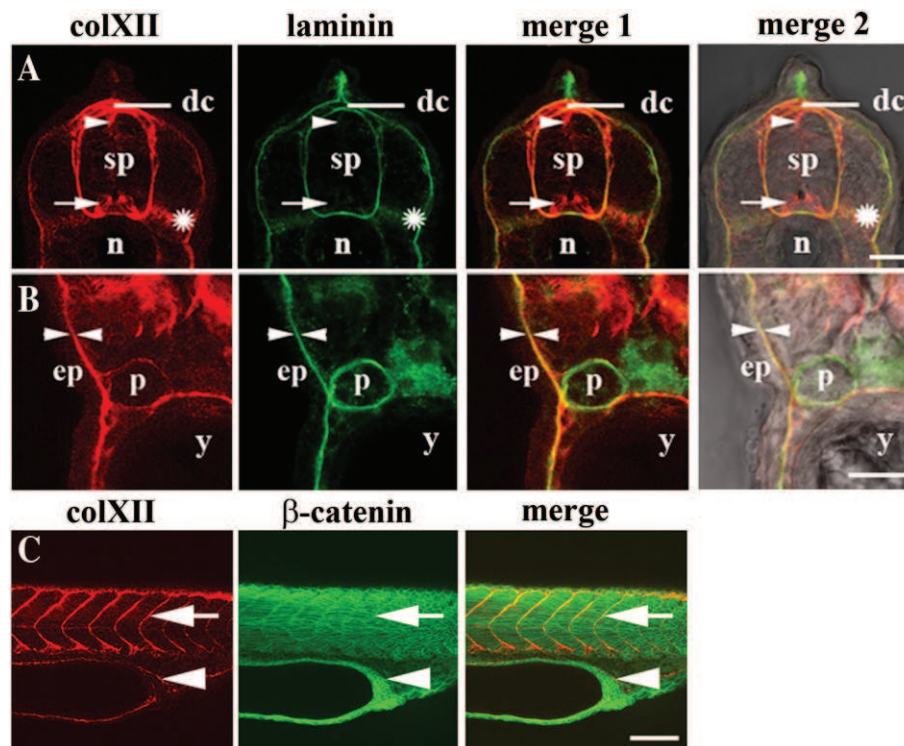
Based on the zebrafish *col12a1* gene, a *col12a1* mRNA has been predicted (XM\_678521), but it has not been shown yet whether the full length mRNA is expressed *in vivo*. However, we were able to demonstrate by Western blot that the collagen XII  $\alpha 1$  chain is expressed in zebrafish tissues. Our antibodies immunoprecipitated a band of ~200 kDa from protein extract of adult zebrafish (Fig. 2B), which fits well the molecular weight of 203 kDa calculated for the predicted amino acid sequence (XP\_683613) with the ProtParam tool

(ExPASy Proteomics server). Furthermore, this band was, as expected, collagenase sensitive. Since the  $\alpha 1$  chain of collagen XII consists predominantly of non-collagenous domains, treatment with collagenase resulted only in a small shift. These biochemical data are in agreement with studies that have characterized the mammalian and avian collagen XII  $\alpha 1$  chain (reviewed in Ricard-Blum et al., 2000).

### 2.3. *Col12a1* mRNA expression starts during somitogenesis and is developmentally regulated

The sequence cloned for the preparation of the fusion protein (AM941493, Fig. 1B) was also used for the preparation of two different anti-sense probes. Since the two probes gave identical staining patterns, they are not distinguished below.

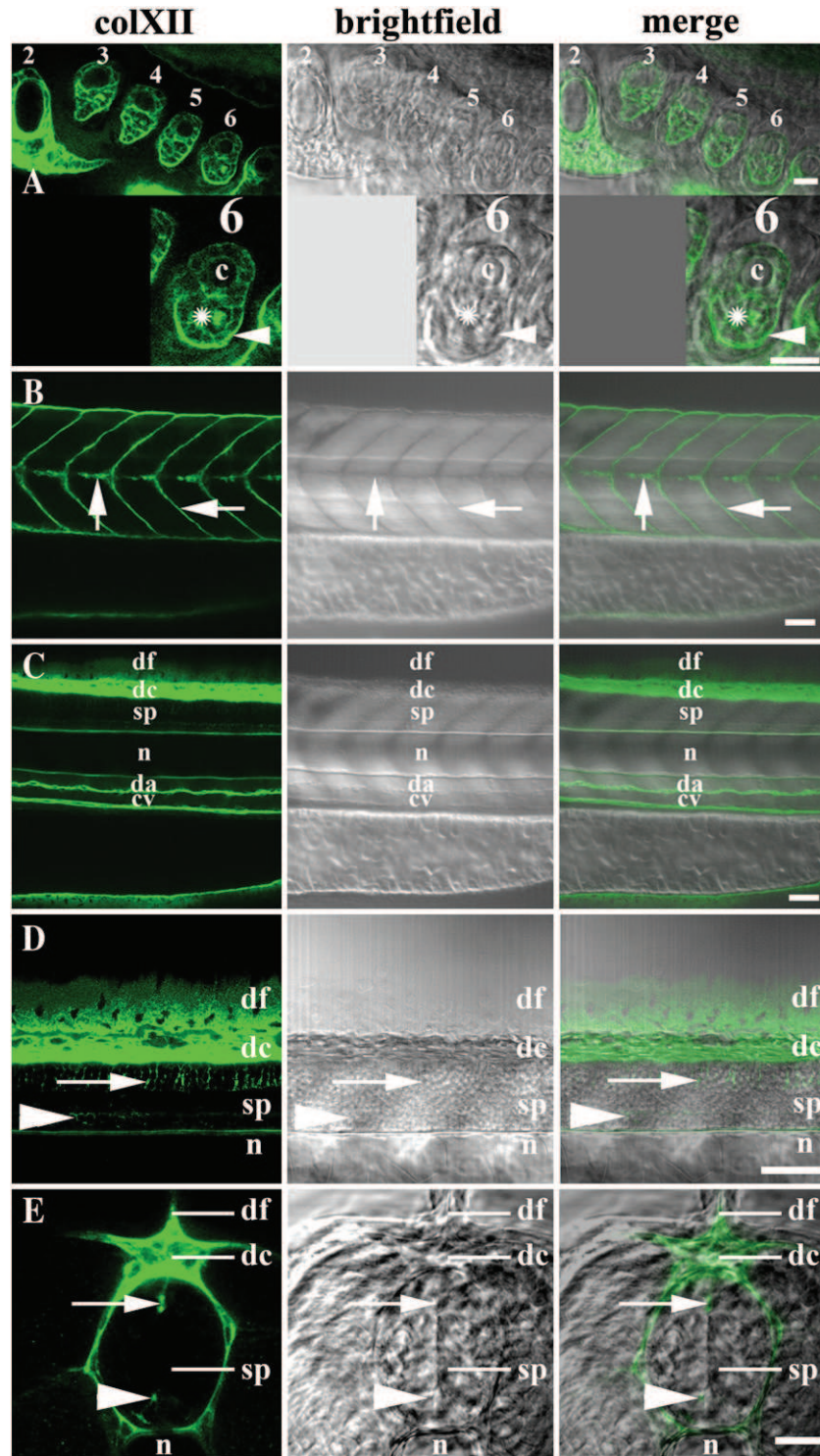
We did not detect collagen XII transcript at any stage before the onset of somitogenesis: 256 cells, sphere, shield, 80% epiboly (data not shown). At the 10-somite stage, collagen XII transcript was distributed diffusely throughout the embryo (Fig. 3A) and at the 18-somite stage, transcript was in addition found in a narrow band within the brain (Fig. 3B), which may correspond to a rhombomer. At the 21-somite stage (data not shown) and at 24hpf, collagen XII transcript was expressed in interspersed cells in the skin corresponding probably to dermal fibroblasts (Fig. 3C). At these stages, collagen XII expression was not detected within the brain anymore, but diffusely throughout the head. A strong expression was also observed in the head mesenchyme lateral and ventro-lateral to the hindbrain, extending up to the midbrain-hindbrain boundary (see Fig. 3D; compare Fig. 4F). A punctuate expression was observed in the ventral tail at the level of



**Fig. 5.** Double immunofluorescence staining of the tail of a 24hpf embryo with antibodies specific for collagen XII and laminin or  $\beta$ -catenin. Indirect whole mount immunofluorescence staining, all images are confocal images. Rows A–B show a double immunofluorescence staining with antibodies specific for collagen XII and laminin. Each row shows collagen XII staining (red), laminin staining (green), an overlay of both stainings (merge 1), and an overlay of collagen XII and laminin staining with the bright field image (merge 2). Row C shows a double immunofluorescence staining with antibodies specific for collagen XII and  $\beta$ -catenin. Collagen XII staining (red),  $\beta$ -catenin staining (green) and an overlay of both stainings (merge) are shown. Rows A–B: transversal sections of the tail at the level of the yolk sac extension, dorsal up. Sections were made manually after staining. Row A shows collagen XII staining in the meninges surrounding the spinal cord (sp) and within the spinal cord at the dorsal midline (small arrowhead) and in the floor plate (small arrow). The asterisk indicates diffuse staining in the nascent horizontal myoseptum. dc, dorsal connective tissue, n, notochord. Row B shows the region adjacent to the pronephric duct (p), double arrowheads indicate the staining beneath the epidermis (ep). y, yolk sac extension. Row C shows a sagittal optical section of the tail, lateral view, anterior to the left, dorsal up. The big arrows and arrowheads points to the vertical myoseptum and the pronephric duct, respectively. Scale bars correspond to 20  $\mu$ m (rows A, B) and 100  $\mu$ m (row C), respectively.

the blood vessels and the pronephric duct (Fig. 3E). Collagen XII transcript was at this stage also expressed within the dorsal and ventral spinal cord (Fig. 3F). The ventral expression domain within the

spinal cord corresponded to the floor plate. At 48hpf, *col12a1* message was detected in the meninges (Fig. 3G), the connective tissue sheath encasing the nasal pit (Fig. 3H) and the sclera (Fig. 3I). Transversal



**Fig. 6.** Immunofluorescence staining of 48hpf (row E) and 72hpf (row A–D) embryos with anti-collagen XII antibodies. Indirect whole mount immunofluorescence staining, all images are confocal images. Each row shows collagen XII staining (green), the bright field image and an overlay of both (merge). Row A–D show lateral views of the head (row A) or tail (rows B–D) of a 72hpf embryo, anterior is to the left and dorsal is up. Row E shows a transversal section of the tail of a 48hpf embryo at the level of the yolk sac extension. The section was made manually after staining. The image focuses on the spinal cord (sp), dorsal is up. Row A shows pharyngeal arches 2 to 6; the inset shows a higher magnification of pharyngeal arch 6. Inset row A: the anti-collagen XII antibodies stain the perichondrium surrounding the cartilaginous element (c) of the pharyngeal arch as well as the connective tissue septa of the skeletal muscle subjacent to the cartilage element (asterisk). In addition, surrounding ECM is stained (small arrowhead). Rows B–D show sagittal (row B) and median (row C, D) optical sections of the tail, row D shows a higher magnification of the dorsal region of the optical section shown in row C. Row B: the short arrows point to vertical and horizontal myosepta. Rows C–E: df, dorsal fin fold; dc, dorsal connective tissue; sp, spinal cord; n, notochord; da, dorsal aorta; cv, posterior caudal vein. Rows C, E: The long arrows and the big arrowheads point to collagen XII staining at the dorsal midline of the spinal cord and at the lateral borders of the floor plate, respectively. Scale bars = 20  $\mu$ m (row A, inset row A, row E), 50  $\mu$ m (row B–D).



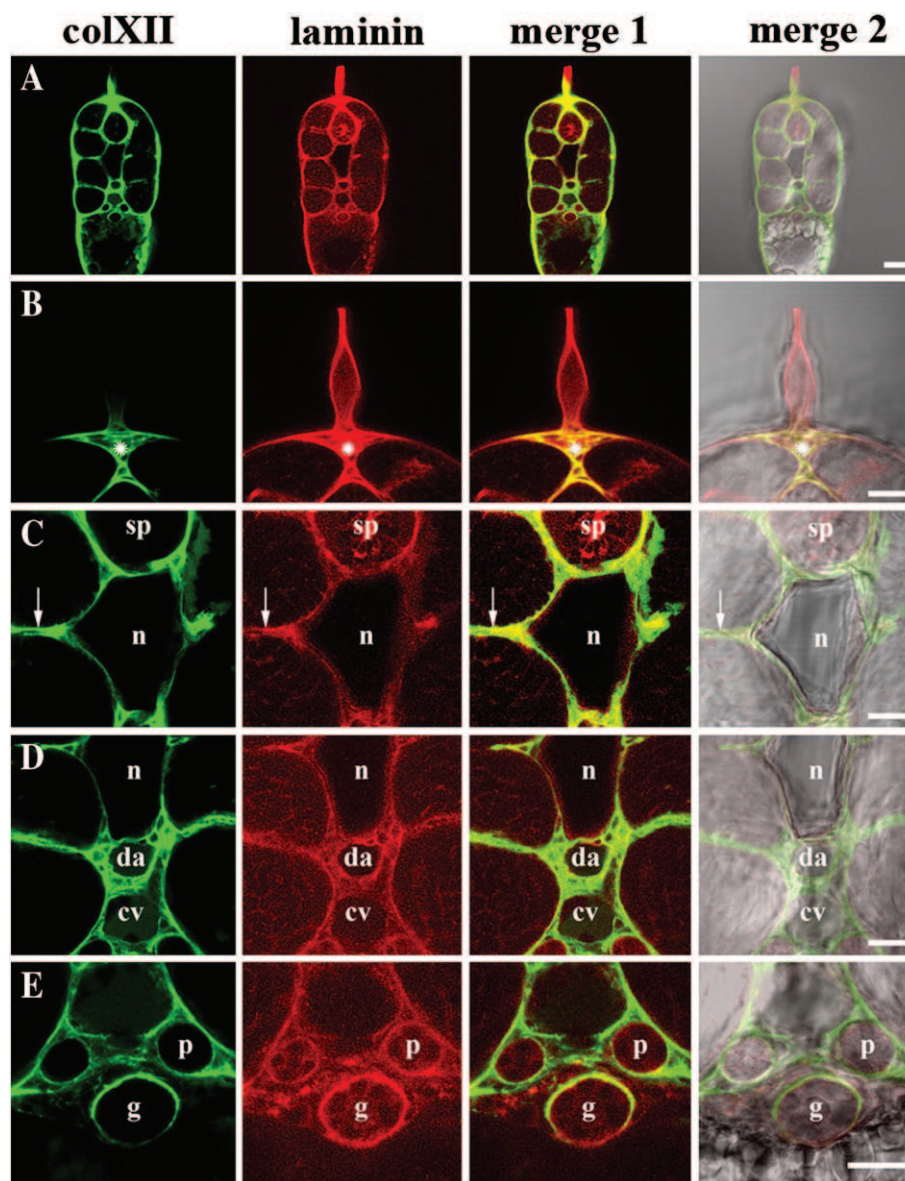
sections of the head confirmed that the transcript was not expressed within these organs, but in the surrounding connective tissue sheaths (data not shown). At this stage, collagen XII transcript was still expressed in interspersed cells in the skin, and the punctuate expression in the ventral tail had increased (Fig. 3J, K). Within the spinal cord, collagen XII expression was now dorsally restricted to the midline and expression in the floor plate had ceased with the exception of a weak expression at the lateral borders. In addition, *col12a1* message was now detected in tissue situated between the dorsal tips of the myotomes, the spinal cord and the dorsal fin fold (Fig. 3L). Although neural crest cells may be still found in this region at early developmental stages (<24hpf), we assume that this tissue corresponds at later stages to connective tissue and will refer to it hereafter as dorsal connective tissue.

At 72hpf, the signal in the head was weak and expression in the tail had almost ceased (Fig. 3M). The transcript was now only detected in the myosepta (Fig. 3N) and the dorsal connective tissue. Expression in

the spinal cord had ceased, and within the dorsal connective tissue, *col12a1* message became restricted to the ventral region (Fig. 3M, O).

#### 2.4. Collagen XII is ubiquitously expressed in connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes

In general, the protein expression matched well the above described expression pattern of the *col12a1* transcript, although the protein persisted often longer than the transcript. Collagen XII was ubiquitously expressed in the connective tissue sheaths (fascia) encasing the organs and tissues of the developing embryo. The staining obtained with the anti-collagen XII antibodies resembled strikingly the staining obtained with an antibody recognizing laminin, a component of all basement membranes. Double immunofluorescence staining revealed that collagen XII and laminin staining coincided ubiquitously, indicating that collagen XII was present not only in connective tissues, but also in basement membranes.



**Fig. 7.** Double immunofluorescence staining of a 72hpf embryo with antibodies specific for collagen XII and laminin (tail). Indirect whole mount immunofluorescence staining, all images are confocal images. Each row shows collagen XII staining (green), laminin staining (red), an overlay of both stainings (merge 1) and an overlay of collagen XII and laminin staining with the bright field image (merge 2). Rows A–E show a transversal section of the tail at the level of the yolk sac extension, dorsal is up. The section was made manually after staining. Rows B–E show higher magnifications of row A focusing on, row B: dorsal connective tissue (asterix); row C: spinal cord (sp), notochord (n) and horizontal myoseptum (arrow); row D: notochord (n), dorsal aorta (da) and posterior caudal vein (cv); row E: pronephric duct (p) and gut (g). Scale bars = 50  $\mu$ m (row A), 20  $\mu$ m (row B–E).

At 24hpf, collagen XII was expressed in the fascia encasing the brain and the sense organs (Fig. 4). Hence, collagen XII was detected in the sclera (Fig. 4B) and the ECM surrounding the nasal pit (Fig. 4C). In the ECM surrounding the eye and the nasal pit, and also in the ECM surrounding the lens, collagen XII staining coincided with laminin staining (Fig. 4B, C). However, the expression domain of collagen XII was broader than the expression domain of laminin: collagen XII was in addition detected in the connective tissue between eye, forebrain and nasal pit (Fig. 4C). Double staining with an anti- $\beta$ -catenin antibody, which at 24hpf stains all cell membranes, revealed that collagen XII protein was at this stage also expressed in the meninges of the brain (Fig. 4D) and the ECM surrounding the ear placode (Fig. 4E). Collagen XII expression was not restricted to fascia: the anti-collagen XII antibodies stained also the head mesenchyme situated laterally and ventrally to the hindbrain, up to the midbrain–hindbrain boundary (Fig. 4F).

In the tail, collagen XII expression was observed in the meninges of the spinal cord and the dorsal connective tissue beneath the nascent dorsal fin fold (Fig. 5A). Furthermore, collagen XII was detected in the epimysia encasing the myotoma and in the vertical myosepta (Fig. 5A, C and data not shown). A diffuse expression was also observed in the nascent horizontal myoseptum (Fig. 5A). Anti-collagen XII antibodies stained also the ECM beneath the epidermis (Fig. 5B) and, albeit weakly, the ECM surrounding the pronephric duct (Fig. 5B,C). In the tail, collagen XII staining coincided with laminin staining in the meninges of the spinal cord, the epimysia and myosepta and the ECM beneath the epidermis as well as the ECM surrounding the pronephric duct (Fig. 5A, B and data not shown).

At 48hpf and 72hpf, collagen XII expression was maintained in the connective tissue sheaths of the head and beneath the epidermis (data not shown). At these stages, collagen XII staining was in addition detected in the pharyngeal arches. Within the pharyngeal arches, collagen XII stained the perichondria of the cartilage elements, as well as the connective tissue septa of the adjacent skeletal muscle (Fig. 6A and data not shown).

In the tail, collagen XII expression was now clearly visible in the horizontal myosepta in addition to the vertical myosepta (Fig. 6B and data not shown). At 48hpf and 72hpf, collagen XII was furthermore detected in dorsal aorta and caudal vein (Fig. 6C, and data not shown) and in the ECM surrounding the pronephric duct and the gut (Fig. 7E). In the perichordal sheath, collagen XII expression became first apparent at 24hpf (data not shown), and this expression domain was maintained at 48hpf and 72hpf (Fig. 6C and data not shown). Collagen XII was also still detected in the meninges of the spinal cord and the dorsal connective tissue and was now in addition expressed in the proximal dorsal fin fold

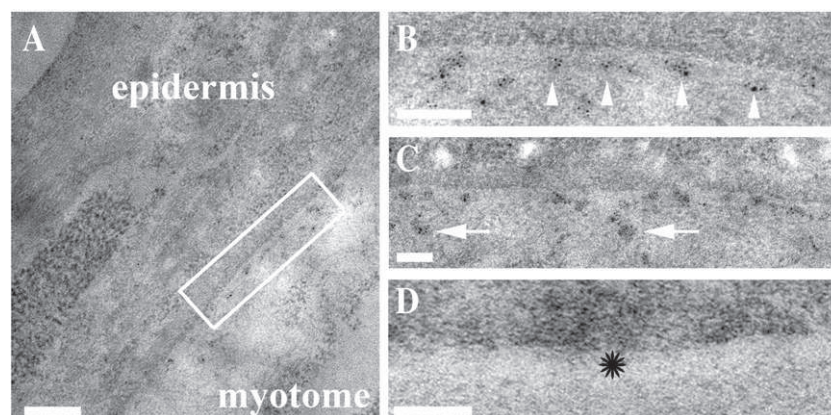
(Fig. 6C–E, Fig. 7B). At both 48hpf and 72hpf, collagen XII and laminin staining coincided ubiquitously (Fig. 7A and data not shown). Hence, both the anti-collagen XII and the anti-laminin antibodies stained the meninges of the spinal cord, the horizontal myoseptum and the perichordal sheath (Fig. 7C), the dorsal aorta and the caudal vein (Fig. 7D) and the ECM surrounding the pronephric duct and the gut (Fig. 7E). Hence, collagen XII delimited all organs and tissues of the developing embryo, and double immunofluorescence staining with laminin antibodies indicated that collagen XII was associated with basement membranes. However, the collagen XII expression domain was often broader than the laminin expression domain: collagen XII was expressed in fascia, the thin connective tissue sheaths surrounding the different tissues and organs, in addition to basement membranes.

## 2.5. Collagen XII is expressed in the spinal cord

Besides connective tissues and basement membranes, the anti-collagen XII antibodies stained also the spinal cord. At 24hpf, collagen XII was expressed weakly throughout the spinal cord (see supplementary data 1, S1) and strongly at the dorsal midline and in the floor plate (Fig. 5A). At 48hpf and 72hpf, collagen XII expression within the spinal cord became restricted to morphologically discernable interfaces. Dorsally, collagen XII was detected in filament like extensions located at the midline of the spinal cord and ventrally to the lateral borders of the floor plate (Fig. 6D, E).

## 2.6. Immunogold electron microscopy confirms that collagen XII staining localizes to connective tissues and extends into basement membranes

The connective tissues of the developing embryo are often very thin. For example, at 72hpf, the dermis is still acellular and consists of a collagenous stroma that is only 200 nm thick (Le Guellec et al., 2004). The resolution of confocal microscopy is therefore insufficient to distinguish unambiguously basement membranes and subjacent connective tissues. To elucidate the localization of collagen XII at the ultrastructural level, we performed immunogold electron microscopy of ultrathin sections of 72hpf embryos. We observed that collagen XII localizes to both basement membranes and connective tissues. In the skin, the collagen XII antibodies stained the collagenous stroma (Fig. 8C), but were also associated with the epidermal–dermal basement membrane (Fig. 8B). Collagen XII staining extended to the side of the basement membrane that faces the connective tissue, the *lamina densa* (Fig. 8B). The anti-collagen XII antibodies were also associated with other basement membranes, such as the basement membrane



**Fig. 8.** Collagen XII associates with the epidermal–dermal basement membrane and is present in the dermal stroma. A–D: Immunogold electron microscopy of ultrathin sections of the skin of 72hpf embryos stained with anti-collagen XII antibodies followed by a secondary antibody coupled to 5 nm gold particles (A–C) or stained only with the secondary antibody (D). B–D show the epidermal–dermal basement membrane and the subjacent dermis, which is at this stage acellular and approximately 200 nm thick; the epidermis is up. B shows a higher magnification of the boxed region in A; C, D show comparable regions taken from other images. A, B: arrowheads and arrows indicate collagen XII staining of the lamina densa (A) and the dermal stroma (B), respectively. D: the asterisk marks the basement membrane, which is unstained in the negative control. Scale bars = 400 nm (A), 200 nm (B,C), 100 nm (D).

surrounding the spinal cord (see supplementary data 2, S2, A1–A2) and the notochord (S2, B1–B2). As has been described for other species, collagen XII was also clearly associated to collagen fibrils. A fibril associated staining was for example observed in the perichordal sheath (S2, B1–B2).

### 3. Discussion

#### 3.1. *Col12a1* expression is developmentally regulated and *col12a1* expressing cells are primarily mesenchymal cells or embryonic fibroblasts

*Col12a1* expression in zebrafish started during somitogenesis and was developmentally regulated, which is in agreement with observations made in other species (Yamagata et al., 1991; Bohme et al., 1995). The collagen XII producing cells in the connective tissue sheaths – such as sclera and meninges – are probably fibroblasts or mesenchymal precursors of fibroblasts. In tetrapods, *col12a1* appears to be almost exclusively expressed by fibroblasts (Bohme et al., 1995; Walchli et al., 1994). Very little is known about fibroblasts in zebrafish. Hence, *col12a1* may be a useful marker of both connective tissues and fibroblasts in zebrafish.

Collagen XII was also synthesized within the myoseptum and not by the skeletal muscle adjacent to it. The myoseptum is thought to be acellular at early developmental stages, but it has been reported that cells from a triangular region between myotomes and spinal cord or notochord extend processes into the myoseptum at 2dpf (Kudo et al., 2004). It is likely that *col12a1* transcript localizes to such processes.

Chondrocytes have been also reported to express *col12a1* transcript (Bohme et al., 1995; Wei et al., 1995; Dharmavaram et al., 1998). However, in zebrafish, *col12a1* transcript was detected only in perichondria. Neither transcript nor protein was observed in the cartilage matrix. As is the case in murines (Gregory et al., 2001), expression of zebrafish collagen XII in cartilage may be restricted to specific cartilage types or to specific developmental stages.

Interestingly, at early developmental stages, collagen XII was also synthesized by neuronal tissue, e.g., in a band within the brain at the 18-somite stage and within the spinal cord at later stages. At 24hpf, collagen XII transcript was detected within the floor plate and dorsally in a region that is likely to comprise the roof plate. At 48hpf, the dorsal expression domain was restricted to the midline, corresponding possibly to precursors of ependymal cells. At early developmental

stages, murine *col12a1* has been reported to be expressed by cells lining the lumen of the spinal cord (Bohme et al., 1995), suggesting that this expression domain is conserved between vertebrate species.

#### 3.2. Collagen XII expression in fascia and basement membranes suggests a role in tissue cohesion

Zebrafish collagen XII was ubiquitously expressed in the connective tissue sheaths that encase the organs and tissues of the body, the fascia. In addition to fascia, collagen XII staining extended to basement membranes.

Fascia are essential for the cohesion of the tissues of the body. The expression pattern of collagen XII suggests that it may have a twofold role in tissue cohesion: it may stabilize fascia and it may link fascia to basement membranes. In other species, collagen XII was found to localize to the surface of collagen fibrils and to bind to the ECM proteins decorin and tenascin X (Keene et al., 1991; Font et al., 1996; Veit et al., 2006). It has been proposed that collagen XII and tenascin X may form molecular bridges between adjacent fibrils (Veit et al., 2006). Here, we show that zebrafish collagen XII is also fibril-associated. A zebrafish ortholog of tenascin X has not been described so far, but decorin is conserved in zebrafish (Shintani et al., 2000). In zebrafish, collagen XII could therefore bridge adjacent fibrils through collagen XII–decorin interactions.

Interestingly, *in vitro* assays indicate that collagen XII does not only contribute to the stability, but also to the deformability of the ECM, presumably by allowing adjacent collagen fibrils to glide one over the other (Nishiyama et al., 1994). Furthermore, collagen XII contains many fibronectin type III (FNIII) domains. FNIII domains were shown to unfold reversibly when traction is applied (Oberhauser et al., 1998) and could therefore contribute to the elasticity of the ECM. It is therefore tempting to speculate that collagen XII may be implicated in enhancing the deformability of the ECM, rather than reinforcing the ECM. Deformability may be especially important in embryonic fascia, which may have to stretch to adapt to the fast growth of the tissues and organs that they encase.

Collagen XII may also have a role in linking fascia to basement membranes. We observed that collagen XII was associated with the *lamina densa*, the side of the basement membrane that faces the subjacent connective tissue. It is therefore possible that collagen XII

**Table 1**  
Comparison of the expression pattern of collagen XII in different vertebrate species during embryogenesis

	Zebrafish (T,P)	Newt (T) (Wei et al., 1995)	Chicken (T,P) (Sugrue et al., 1989; Yamagata et al., 1991; Walchli et al., 1994; Koch et al., 1995; Veit et al., 2006)	Bovine (P) (Keene et al., 1991; Watt et al., 1992)	Murine (T,P) (Oh et al., 1993; Bohme et al., 1995; Gregory et al., 2001; Veit et al., 2006)	Human (P) (Keene et al., 1991; Thierry et al., 2004)
Sclera	+	ND	+	ND	+	ND
Meninges	+	ND	+	ND	+/- 5	ND
Dermis	+	ND	+	+	+	+
Tendon	(+) 1	ND	+	ND	+	+10
Skeletal muscle (connective tissue septa)	+ epi-mysium	ND	+ epi-, peri-, endomysium	ND	+ 6 epi-, perimysium	ND
Blood vessel wall	+2	ND	+ tunica media ND: tunica adventitia	ND	+ tunica media, adventitia	+ endothelial BM, tunica media, adventitia
Fibrocartilage* (intervetebral disc)	ND	ND	+	ND	+	ND
Hyaline cartilage (templates of endochondral bone)	–	–	–	+	+/- 7	ND
Perichondrium	+	+	+	+	+	ND
Periosteum	ND	ND	+	ND	+	ND
BM dermis/epidermis	+	ND	ND	ND	(+) 8	+
BM kidney	(+) 3, 4	ND	ND	ND	(-) 9	+
BM gut	(+) 3	ND	ND	ND	(-) 9	+

\*Fibrocartilage expresses both collagen I and II, whereas hyaline cartilage expresses exclusively collagen II.

+/-: expression observed/not observed; ND: not determined; T,P: data from analysis of transcript (T) and protein (P) expression, respectively.

1: expression in myosepta, which are considered to be the teleost homolog of tendon; 2: localization within blood vessel wall unclear 3: colocalisation with laminin; localization at the ultrastructural level was not checked. 4 expression in BM of pronephric duct. The pronephros is the teleost homolog of the kidney; 5: protein was found only in the meninges of the brain, however, transcript was also found within the spinal cord; 6: data from neonatal mice 7: Gregory et al. reported expression in articular cartilage and the growth plate 8: Koch et al., unpublished observation; 9: Oh et al reported that gut and kidney were negative; 10: data from tendon biopsy.



links collagen fibrils to components of the basement membrane. Since collagen XII binds to heparin (Koch et al., 1995), it may bind to the heparan sulfate chains of basement membrane proteoglycans.

### 3.3. Collagen XII expression in fascia and basement membranes is conserved between vertebrate species

Here, we show that collagen XII has a broader expression pattern than previously thought. However, the comparison of collagen XII expression in different species (listed in Table 1) indicates that its expression pattern is conserved among vertebrates. For example, collagen XII expression in dermis, sclera, meninges, connective tissue septa of skeletal muscle, perichondria and blood vessels has been also observed in other species (Table 1). In tetrapods, collagen XII is found in tendon and the myoseptum is considered to be the teleost homolog of tendon (Gemballa et al., 2003; Kudo et al., 2004). Our observation that both vertical and horizontal myosepta were collagen XII positive confirms the homology of tendon and myoseptum at the molecular level. A localization of collagen XII to basement membranes has been also described for human embryogenesis (Thierry et al., 2004) and human and rabbit corneal basement membranes (Wessel et al., 1997; Anderson et al., 2000).

Interestingly, within tendon, collagen XII was found to localize to the connective tissue sheaths between fascicles (Zhang et al., 2003), and within the cornea, it was found to localize to the subepithelial and subendothelial stroma (Gordon et al., 1996; Young et al., 2002) and to the interfaces of the collagen lamellae in the stroma proper (Wessel et al., 1997), suggesting that, besides linking fascia to basement membranes, collagen XII may have a general role in integrating different matrices.

### 3.4. In the perichordal sheath, collagen XII may colocalize with collagen II

We observed collagen XII expression in virtually all connective tissues except cartilage. As is the case in other species (Walchli et al., 1994), zebrafish collagen XII appears therefore to codistribute with the fibrillar collagen I. Collagen I is highly conserved in teleost and *col1a2* message has been detected in at least some tissues that express also *col12a1*, such as the skin and the sclera (Dubois et al., 2002). It is very likely that most of the other collagen XII positive connective tissues express also collagen I.

The perichordal sheath may be an exception. Since the zebrafish notochord and floor plate were found to express *col2a1* transcript (Yan et al., 1995), it is likely that the perichordal sheath is made up of fibrils of type II collagen. An association of collagen XII with fibrils of type II collagen has been previously reported (Gregory et al., 2001). The zebrafish perichordal sheath may be another example of collagen XII–collagen II interactions.

### 3.5. Collagen XII is expressed in head mesenchyme and spinal cord

Collagen XII was also detected in head mesenchyme and neuronal tissue. Mesenchyme shares many features with connective tissues (Hay, 2005) and our finding that collagen XII is expressed in head mesenchyme confirms this resemblance. On the other hand, our observation that collagen XII is expressed in the spinal cord is surprising, since fibrillar and FACIT collagens are generally only expressed in the surrounding ECM, e.g. the meninges. However, in early development, the neuroepithelium may have characteristics of both epithelia and mesenchyme (Lowery and Sive, 2004), the latter exhibiting connective tissues features. Interestingly, within the spinal cord, collagen XII localized to morphological discernable interfaces: dorsally, to the midline, and ventrally to the borders of the floor plate. It is therefore tempting to speculate that collagen XII is needed for the cohesion of the two halves of the spinal cord and the cohesion of floor plate and lateral spinal cord. It has been proposed that the floor plate is not derived from the neural plate, but from precursor cells common

to notochord and floor plate that invade the ventral midline during neurulation (Le Douarin and Halpern, 2000), which would explain why a cohesion providing ECM might be needed at the interface of floor plate and lateral spinal cord.

In conclusion, the expression pattern of collagen XII as a whole suggests that it has a role in the cohesion of the tissues of the body by stabilizing and/or enhancing the deformability of fascia, and by providing a link between basement membranes and fascia. However, since collagen XII is present at the pathways of migrating motor axons, neural crest cells and the primordium of the later line (Myers et al., 1986; Raible et al., 1992; Ghysen and Dambly-Chaudière, 2004) it could also serve as a substrate for migration or influence migration by modulating the ECM that serves as a substrate. In the future, *in vivo* knock-down studies will help us to unravel the function of collagen XII.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Fish maintenance

Fish were maintained and eggs were obtained essentially as previously described by Westerfield, 1994. Embryos were staged according to hours post-fertilization (hpf) at 28.5 °C and according to morphological criteria (Kimmel et al., 1995). Different wild type strains (AB, AB/Tu, AB/TL and fish from a pet shop) were used for expression pattern analysis. No difference between the different strains was observed.

### 4.2. Cloning of fibronectin type III domains of zebrafish collagen XII and XIV $\alpha 1$ chains

Sequences spanning four fibronectin type III (FNIII) domains of the zebrafish  $\alpha 1$  (XII) (AM941493) and  $\alpha 1$  (XIV) chain (AM941492), respectively, were cloned. To this end, RNA was extracted from 24hpf AB/Tu embryos using TRIzol Reagent (Invitrogen #15596026). 1  $\mu$ g RNA was reverse transcribed (Promega) and PCR on the cDNA was performed using Pfu Ultra Polymerase (Stratagene) and the following primers: colXII-FNIII: forward primer: cacGCTAGCagaacatccaggtttacaacc, reverse primer: aagCTCGAGttatgtgcgctcttgacactgactc; colXIV-FNIII: forward primer: cacGCTAGCctggtgccagcgccgttcagc, reverse primer: ttgGGATCCttagtatacattatctgtactgg. Restriction sites (bold) and stop codons (italic) were added to the reverse primers. The PCR products were subcloned into the TopoPCR4 vector (Invitrogen) and were sequenced with vector specific primers. Sequencing of two independent clones gave the same result.

### 4.3. Expression and purification of colXII-FNIII and colXIV-FNIII

The colXII-FNIII and colXIV-FNIII sequences were excised from the vector, gel-purified (Qiagen) and ligated (Rapid Ligation Kit, Roche) into the bacterial expression vector pET15b (Novagen). A modified vector with an added NheI restriction site was used. Subsequently, the plasmid was transformed into the Rosetta strain (Novagen). Bacteria were induced by adding isopropyl thiogalactoside (IPTG) at OD 0.5–0.8 at a final concentration of 0.5 mM and were grown for approximately 16 h at 30 °C. After centrifugation (15000 rpm, 15 min, 4 °C), bacteria were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris, 0.5M NaCl, 7M Urea, pH8) and were sonicated. For purification of the His-tagged fusion proteins, a nickel chelated sepharose column was prepared by adding 50 mM NiSO<sub>4</sub> to a sepharose matrix (Amersham Bioscience, #17-0575-01). The supernatant of the bacteria lysat was applied to the equilibrated column. After washing with lysis buffer, the fusion protein was renatured with Tris buffer (20 mM Tris, 0.5M NaCl, pH8) and was eluted with an Imidazole step gradient (10–250 mM Imidazole in Tris buffer, pH 8 or pH6). Fractions containing the fusion protein were pooled and dialyzed against TBS pH8 or, for immunization, PBS pH8.



#### 4.4. Preparation and affinity-purification of polyclonal antibodies specific for zebrafish collagen XII

The purified recombinant colXII-FNIII protein was used to immunize a rabbit and a guinea pig, respectively. The antisera were purified by affinity-chromatography using a column of CNBr-activated sepharose (Amersham Bioscience #1704301) coupled to antigen. After washing the column several times with TBS pH8, specific antibodies were eluted with 0.1 M Triethylamine, 0.15 M NaCl, pH 11.5 and neutralized with 1 M Tris/HCl, pH6.8. The antibodies were dialyzed against TBS, pH7.5 and concentrated with a centrifugal filter unit (Millipore) to 1mg/ml.

#### 4.5. ELISA style assay

96 well plates (flat bottom high binding, Greiner) were coated overnight at 4 °C with 20 ng/well purified recombinant colXII-FNIII or colXIV-FNIII protein in PBS pH7.4 or with 20 ng/well BSA (Pierce #23209) for a negative control. After washing repeatedly with PBS pH7.4, 0.05% Tween 20 (Sigma), wells were incubated 2 h at room temperature in blocking solution: PBS pH7.4, 5% BSA (Sigma A7906). Primary and secondary antibodies were also diluted in blocking solution. Wells were incubated 1h at room temperature with 1:1 serial dilutions of the primary antibodies, were washed repeatedly and were incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibodies (horse radish peroxidase conjugated to anti-rabbit IgG (Biorad #1706515) or to anti-guinea pig IgG (Jackson ImmunoResearch #106-035-063)). Wells were then washed again several times and were incubated for 5–15 min with substrate (0.5 mg/ml ABTS (Sigma A1888) in 0.1 M NaHPO<sub>4</sub>, 0.08M citric acid, 0.009% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Finally, absorption was measured with an ELISA reader at 405 nm.

#### 4.6. Immunoprecipitation and collagenase digestion of the zebrafish collagen XII $\alpha$ 1 chain

Adult zebrafish were sacrificed and homogenized with an Ultra-Turax homogenisator in TBS pH8, 1% NP-40, 2 mM EDTA and proteinase inhibitor cocktail (Roche #11873580001). Protein extract was blocked 1 h at 4 °C with sepharose, and was subsequently incubated overnight at 4 °C with CNBr-activated Sepharose (Amersham Bioscience #1704301) coupled to affinity-purified rabbit polyclonal antibodies specific for zebrafish collagen XII. The beads were transferred to a spin column (Biorad # 732-6204) and were washed with TBS pH 7.4, 0.05% Tween 20 (Sigma) (TBST). Bound collagen XII was incubated for 4 h with 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Pefablock (Roche) in TBS pH7.4 with or without 2000 U/ml collagenase (CLSPA, Worthington biochemical corporation). After digestion, the spin column was washed with TBST and the protein was eluted with 0.1 M Triethylamine, pH 11.5. The eluate was neutralized with 1 M Tris-HCl, pH6.8, concentrated and separated by a 4%–15% gradient SDS-PAGE before blotting onto a PVDF membrane (Millipore #IPVH00010) using a TRIS-glycine buffer containing 20% methanol. The membrane was incubated 2 h at room temperature in blocking solution (TBST, 5% skimmed milk). Incubation with guinea pig polyclonal antibodies specific for zebrafish collagen XII (1:3000) was performed overnight at 4 °C and after washing with TBST, the membrane was incubated 2 h at room temperature with horse radish peroxidase conjugated anti-guinea pig IgG (1:5000, Sigma A5545). After washing with TBST, proteins were revealed using a chemiluminescence substrate kit (ECL Kit, Amersham #RPN2109).

#### 4.7. Whole mount in situ hybridization

For the preparation of two different *col12a1* specific probes, the colXII-FNIII sequence (AM941493) was digested with NCOI and the resulting 670bp and 410bp fragments were subcloned and were used

to prepare digoxigenin labeled anti-sense probes (Roche). Whole mount in situ hybridization was performed as previously described (Hauptmann and Gerster, 2000). 48hpf and 72hpf embryos were treated with PTU to suppress pigmentation (see below).

#### 4.8. Whole mount immunofluorescence staining

Staining was performed in 1.5 ml plastic tubes on up to 15 embryos. If not indicated otherwise, the different steps were performed at room temperature under gentle agitation. 48hpf and 72hpf embryos were treated with PTU to suppress pigmentation. To this end, PTU (Sigma P7629) was added to the fish water at approximately 22hpf at a final concentration of 0.003%. Embryos were sacrificed with an overdose of Tricaine (Sigma A5040) and were subsequently fixed for 3 h at room temperature or overnight at 4 °C in PBS, pH7.4, with 4% Paraformaldehyde (PFA). Before permeabilization, embryos were washed with PBS 0.1% Tween 20, pH 7.4 (PBST). 72hpf embryos were washed 3×5 min and 24hpf and 48hpf embryos were washed 4×15 min, 1×30 min. Permeabilization was performed by incubating embryos 5 min in distilled water, 10 min in ice cold acetone and again 5 min in distilled water without agitation. Embryos were then washed 2×5 min with PBST. 72hpf embryos were in addition incubated for 15 min in PBST, 10 µg/ml proteinase K (Roche # 03115887001). Furthermore, 72hpf embryos were refixed for 20 min with PBS 4% PFA and were washed 4×15 min with PBST. Embryos of all stages were incubated for 30 min at room temperature in blocking solution (PBST, 1% DMSO, 2% Sheep Serum (Sigma S2263), 1% BSA (Sigma A7906)). Incubation with the primary antibodies was performed for 4 h at room temperature or overnight at 4 °C. After washing 4×15 min, 1×30 min with PDT (PBS 0.01% Tween, 1% DMSO, pH 7.4), embryos were incubated with fluorochrome coupled secondary antibodies for 4 h at room temperature or overnight at 4 °C. Finally, after washing 4×15 min, 1×30 min with PDT, the embryos were stored at 4 °C in fluorescent mounting medium (DakoCytomation S3023) and were mounted for observation in 70% Glycerol with or without 1% low melting point agarose (GibcoBRL #15517-014). Approximately 1 to 2 somite thick transversal sections were performed manually after staining, using single-edge razor blades (electron microscopy science #71962, [www.emsdiasum.com](http://www.emsdiasum.com)). Observations were made with a confocal microscope (Axioplan2 LSM510, Zeiss).

The following primary and secondary antibodies were used at the indicated dilutions: affinity-purified guinea pig polyclonal antibodies specific for zebrafish collagen XII, 1:250 or 1:400; affinity-purified rabbit polyclonal antibodies specific for zebrafish collagen XII, 1:400; mouse monoclonal anti- $\beta$ -catenin antibody (Sigma 7207), 1:400; rabbit anti-laminin antibodies (Sigma L9393 – chain specificity unknown), 1/200; anti-guinea pig IgG antibody coupled to Cy2 or Cy3 (Jackson ImmunoResearch), 1:200; anti-rabbit and anti-mouse IgG coupled to Alexa488 (Invitrogen), 1:200 and 1:500, respectively; anti-rabbit IgG coupled to Alexa543 (Invitrogen), 1:400. For the antibody preincubation assay, purified polyclonal guinea pig anti-zebrafish collagen XII antibodies diluted 1:250 in blocking solution was incubated with 8µg purified recombinant colXII-FNIII or colXIV-FNIII protein overnight at 4 °C. Subsequently, whole mount immunofluorescence staining of 48hpf embryos was performed as described above.

#### 4.9. Immunogold electron microscopy

Briefly, whole or bisected embryos were fixed in DMEM buffered 0.1% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde on ice for 30 min, rinsed extensively in 0.15 M Tris-HCl, then dehydrated at progressively lower temperatures to – 20 °C in a graded alcohol dilutions to 90%. Tissues were infiltrated in LR White embedding media at – 20 °C, warmed to room temperature, then polymerized at 55 °C. Tissue destined for K4M embedding media was fixed and rinsed similarly, but was taken through graded alcohol to 100%, then infiltrated and embedded in K4M embedding media at – 20 °C and polymerized with

UV light at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ultrathin sections cut from LR White and K4M embedded tissues were mounted on formvar coated slot grids and floated onto pools of the following solutions: 0.15M Tris–HCl pH 7.4 for 15 min, 0.05 M glycine in Tris for 60 min, 2% non-fat dry milk with 0.5% ovalbumin and 0.5% fish gelatin for 30 min, Tris for 5 min, primary antibody diluted 1:10 in 0.15 M Tris–HCl, pH 7.4 for 120 min,  $3 \times$  Tris for 30 min; a combination of 5 and 10 nm goat anti-rabbit colloidal gold conjugate diluted 1:10 for 60 min;  $3 \times$  Tris for 30 min;  $3 \times$  distilled water for 30 min. Sections were contrasted in uranyl acetate and lead citrate prior to evaluation using an FEI Technai G20 transmission electron microscope.

## Acknowledgments

We thank L. Bernard (PRECI, IFR 128 Biosciences Gerland, Lyon) and S. Goetter (Department for Developmental Biology, University of Freiburg) for fish maintenance, and S. Bretaud for assistance with *in situ* hybridizations. Confocal microscopy observations were performed at the PLATIM core facility of the IFR 128 Biosciences Gerland (Lyon) and at the Life Imaging Center of the Institute for Biology I, University of Freiburg. This work was supported by grants from the Emergence Research Program (Région Rhône-Alpes) and from the University Lyon 1 (BQR). H. Bader is a recipient of a PhD fellowship from the University Lyon1 and the German Academic Exchange Service (DAAD).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.matbio.2008.09.580.

## References

- Anderson, S., SundarRaj, S., Fite, D., Wessel, H., SundarRaj, N., 2000. Developmentally regulated appearance of spliced variants of type XII collagen in the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 55–63.
- Bohme, K., Li, Y., Oh, P.S., Olsen, B., 1995. Primary structure of the long and short splice variants of mouse collagen XII and their tissue specific expression during embryonic development. *Dev. Dyn.* 204, 432–445.
- Burch, G.H., Gong, Y., Liu, W., Dettman, R.W., Curry, C.J., Smith, L., Miller, W.L., Bristow, J., 1997. Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers–Danlos Syndrome. *Nat. Genet.* 17, 104–108.
- Dharmavaram, R.M., Huynh, A.I., Jimenez, S.A., 1998. Characterization of human chondrocyte and fibroblast type XII collagen cDNAs. *Matrix Biol.* 16, 343–348.
- Dubois, G.M., Haftck, Z., Crozet, C., Garrone, R., Le Guellec, D., 2002. Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for alpha2 type I collagen of zebrafish. *Gene* 294, 55–65.
- Fluck, M., Tunc-Civelek, V., Chiquet, M., 2000. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J. Cell. Sci.* 113, 3583–3591.
- Font, B., Eichenberger, D., Rosenberg, L.M., van der Rest, M., 1996. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, Decorin and Fibromodulin. *Matrix Biol.* 15, 341–348.
- Gerecke, D.R., Olson, P.F., Koch, M., Knoll, J.H., Taylor, R., Hudson, D.L., Champlaud, M.F., Olsen, B.R., Burgeson, R.E., 1997. Complete primary structure of two splice variants of collagen XII and assignment of alpha 1(XII) collagen (COL12A1), alpha 1(IX) collagen (COL9A1) and alpha 1(XIX) collagen (COL19A1) to chromosome 6q12–q13. *Genomics* 41, 236–242.
- Gemballa, S., Ebmeyer, L., Hagen, K., Hannich, T., Hoja, K., Rolf, M., Treiber, K., Vogel, F., Weitbrecht, G., 2003. Evolutionary transformations of myoseptal tendons in gnathostomes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 1229–1235.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C., 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 67–73.
- Gordon, M.K., Foley, J.W., Linsenmayer, T.F., Fitch, J.M., 1996. Temporal expression of types XII and XIV collagen mRNA and protein during avian corneal development. *Dev. Dyn.* 206, 49–58.
- Gregory, K.E., Keene, D.R., Lunstrum, G.P., Morris, N.P., 2001. Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2005–2016.
- Hauptmann, G., Gerster, T., 2000. Multi-colour whole mount *in situ* hybridization. *Methods Mol. Biol.* 137, 139–148.
- Hay, E.D., 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn.* 233, 706–720.
- Kania, A.M., Reichenberger, E., Baur, S.T., Karimbux, N.Y., Taylor, R.W., Olsen, B.R., Nishimura, I., 1999. Structural variation of type XII collagen at its carboxyl-terminal NC1 domain generated by tissue-specific alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 274, 22053–22059.
- Keene, D.R., Lunstrum, G.P., Nicholas, P.M., Stoddard, D.W., Burgeson, R.E., 1991. Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J. Cell Biol.* 113, 971–978.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Koch, M., Bohrmann, B., Matthison, M., Hagios, C., Trueb, B., Chiquet, M., 1995. Large and small splice variants of collagen XII: differential expression and ligand binding. *J. Cell Biol.* 130, 1005–1014.
- Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K., Inohaya, K., Kudo, A., 2004. Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev. Biol.* 267, 473–487.
- Le Guellec, D., Morvan-Dubois, G., Sire, J., 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* 48, 217–231.
- Le Douarin, N.M., Halpern, M.E., 2000. Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 23–30.
- Lowery, A.L., Sive, H., 2004. Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech. Dev.* 121, 1189–1197.
- Mao, J.R., Taylor, G., Dean, W.B., Wagner, D.R., Afzal, V., Lotz, J.C., Rubin, E.M., Bristow, J., 2002. Tenascin-X deficiency mimics Ehlers–Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat. Genet.* 30, 421–425.
- Myers, P.Z., Eisen, J.S., Westerfield, W., 1986. Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J. Neurosci.* 8, 2278–2289.
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33–43.
- Nishiyama, T., McDonough, A.M., Bruns, R.R., Burgeson, R.E., 1994. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers *in vitro* and may modulate extracellular matrix deformability. *J. Biol. Chem.* 269, 28193–28199.
- Oberhauser, A.F., Marszalek, P.E., Erickson, H.P., Fernandez, J.M., 1998. The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* 393, 181–185.
- Oh, S.P., Griffith, M., Hay, E.D., Olsen, B.R., 1993. Tissue-specific expression of type XII collagen during mouse embryonic development. *Dev. Dyn.* 196, 37–46.
- Postlethwait, J., Amores, A., Cresko, W., Singer, A., Yan, Y.L., 2004. Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* 20, 481–490.
- Raible, D.W., Wood, A., Hodsdon, W., Henion, P.D., Weston, J.A., Eisen, J.S., 1992. Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* 195, 29–42.
- Ricard-Blum, S., Dublet, B., van der Rest, M., 2000. Unconventional Collagens Types VI, VII, VIII, IX, X, XIV, XVI and XIX in Protein Profile. Oxford University Press, pp.155.
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* 53, 430–442.
- Shintani, S., Sato, A., Toyosawa, S., O'huqin, C., Klein, J., 2000. Biglycan-like extracellular matrix genes of agnathans and teleosts. *J. Mol. Evol.* 51, 363–373.
- Sugrue, S.P., Gordon, M.K., Seyer, J., Dublet, B., van der Rest, M., Olsen, B.R., 1989. Immunoidentification of type XII collagen in embryonic tissues. *J. Cell Biol.* 109, 939–945.
- Thierry, L., Geiser, A.S., Hansen, A., Tesche, F., Herken, R., Miosge, N., 2004. Collagen types XII and XIV are present in basement membrane zones during human embryonic development. *J. Mol. Histol.* 235, 803–810.
- Trachslin, J., Koch, M., Chiquet, M., 1990. Rapid and reversible regulation of collagen XII expression by changes in tensile stress. *Exp. Cell Res.* 247, 320–328.
- Veit, G., Hansen, U., Keene, D.R., Bruckner, P., Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M., Koch, M., 2006. Collagen XII interacts with avian Tenascin-X through its NC3 domain. *J. Biol. Chem.* 281, 39746–39756.
- Walchli, C., Koch, M., Chiquet, M., Odermatt, B.F., Trueb, B., 1994. Tissue-specific expression of fibril-associated collagens XII and XIV. *J. Cell Sci.* 107, 669–681.
- Watt, S.L., Lunstrum, G., McDonough, A.M., Keene, D.R., Burgeson, R.E., Nicholas, P.M., 1992. Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J. Biol. Chem.* 267, 20093–20099.
- Wessel, H., Anderson, S., Fite, D., Halvas, E., Hempel, J., SundarRaj, N., 1997. Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 2408–2422.
- Westerfield, M., 1994. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). Institute of Neuroscience. University of Oregon, Eugene.
- Wei, Y., Yang, E.V., Klatt, K.P., Tassava, R.A., 1995. Monoclonal antibody MT2 identifies the urodele  $\alpha 1$  chain of type XII collagen, a developmentally regulated extracellular matrix protein in regenerating newt limbs. *Dev. Biol.* 168, 503–513.
- Yamagata, M., Yamada, K.M., Yamada, S.S., Shinomura, T., Tanaka, H., Nishida, Y., Obara, M., Kimata, K., 1991. The complete primary structure of type XII collagen shows a chimeric molecule with reiterated Fibronectin type III motifs, von Willebrand Factor A motifs, a domain homologous to a noncollagenous region of type IX collagen and short collagenous domains with an Arg–Gly–Asp site. *J. Cell Biol.* 115, 209–221.
- Yan, Y., Hattta, K., Riggelman, B., Postlethwait, J.H., 1995. Expression of type II collagen gene in the zebrafish embryonic axis. *Dev. Dyn.* 203, 363–376.
- Young, B.B., Zhang, G., Koch, M., Birk, D.E., 2002. The roles of type XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J. Cell. Biochem.* 87, 208–220.
- Zhang, G., Young, B.B., Birk, D.E., 2003. Differential expression of type XII collagen in developing chicken metatarsal tendons. *J. Anat.* 202, 411–420.

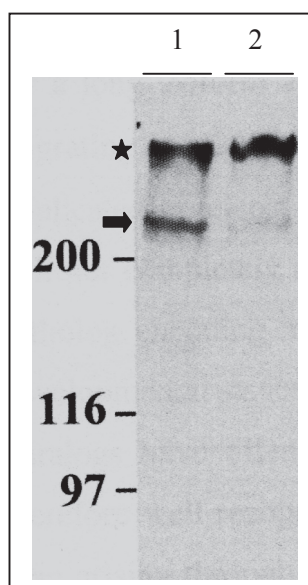
## Résultats préliminaires et discussion :

### Etude fonctionnelle du collagène XII chez poisson :

Chez le poisson, le collagène XII est exprimé de façon ubiquitaire dans les lames basales et dans les enveloppes de tissus conjonctifs entourant tous les organes, appelés « fascias » et. Les fascias sont des feuillet de matrice tri-directionnelle composée chez les tétrapodes de collagènes fibrillaires (I, III, V) et de collagènes non fibrillaires (IV, VI, XII et XIV), d'élastine et de matrice amorphe. Les fascias jouent un rôle primordial dans la cohésion, le développement et l'homéostasie des tissus (Purslow, 2010). Ces observations, conjuguées aux données structurales du collagène XII, suggèrent que ce collagène pourrait jouer un rôle dans la cohésion et la déformabilité des tissus par deux mécanismes distincts. En effet, ce FACIT pourrait non seulement stabiliser les fascias en s'associant aux fibres de collagène mais également permettre un lien structural entre la matrice fibrillaire et la lame basale. Chez la souris, le collagène XII forme un pont moléculaire entre les fibres de collagène et d'autres protéines matricielles environnantes comme la décorine ou la ténascine-X (Keene *et al.*, 1991 ; Font *et al.*, 1996 ; Viet *et al.*, 2006). Il serait intéressant de confirmer ces observations chez le poisson zèbre. Un orthologue de la décorine est présent dans le génome du *Danio rerio* (Shintani *et al.*, 2000), sa présence laisse donc penser que l'interaction collagène XII/décorine est possible. En revanche, aucun orthologue de la ténascine-X n'a pour l'instant été décrit. Cependant, le patron d'expression de la ténascine-C chez le poisson zèbre est superposable à celui du collagène XII (Tongiorgi, 1999). Cette observation suggère qu'une interaction collagène XII/ténascine-C (isoforme de la ténascine-X) serait possible chez le poisson zèbre.

Alors que 2 isoformes courte et longues sont présentes chez les mammifères et chez le poulet, seul l'isoforme courte du collagène XII est présente chez le poisson zèbre (Bader *et al.*, résultats non publiés). Un immuno-transfert sur extrait de poissons sauvage a été réalisé en utilisant un anticorps anti-collagène XII *Danio* spécifique. Ce test a montré la présence de deux bandes (Figure 26) (Bader *et al.*, 2009). La bande migrant un peu au dessus 200KDa correspond au collagène XII. La seconde bande de haut poids moléculaire, pouvait

correspondre à un dimère de collagène XII, comme cela a été décrit chez les mammifères (Koch *et al.*, 1992 ; Koch *et al.*, 1995). Cependant, chez les morphants, si la bande à 200KDa est considérablement diminuée, démontrant l'efficacité du morpholino MO12, l'intensité de la bande de haut poids moléculaire est inchangée. Cette observation prouve que la bande de haut poids moléculaire ne correspond pas à un dimère de collagène XII puisque son expression n'est pas affectée chez le morphant. Cette bande pourrait donc correspondre à un second collagène XII correspondant à la forme longue du collagène XII. Cette hypothèse a été infirmée par une étude bioinformatique réalisée sur le génome du poisson zèbre (Bader *et al.*, résultats non publiés), suggérant qu'il pourrait s'agir d'une autre protéine, non spécifiquement reconnue par l'anticorps anti-collagène XII. Cela confirme qu'il n'existe qu'un gène qui code pour la forme courte du collagène XII chez le poisson zèbre. Il est donc important d'identifier cette bande de haut poids moléculaire. Tant que la bande de haut poids moléculaire reconnue par l'anticorps anti-collagène XII n'a pas été identifiée, les résultats de l'analyse morphotypique des morphants MO12 seront donc à prendre avec précaution.

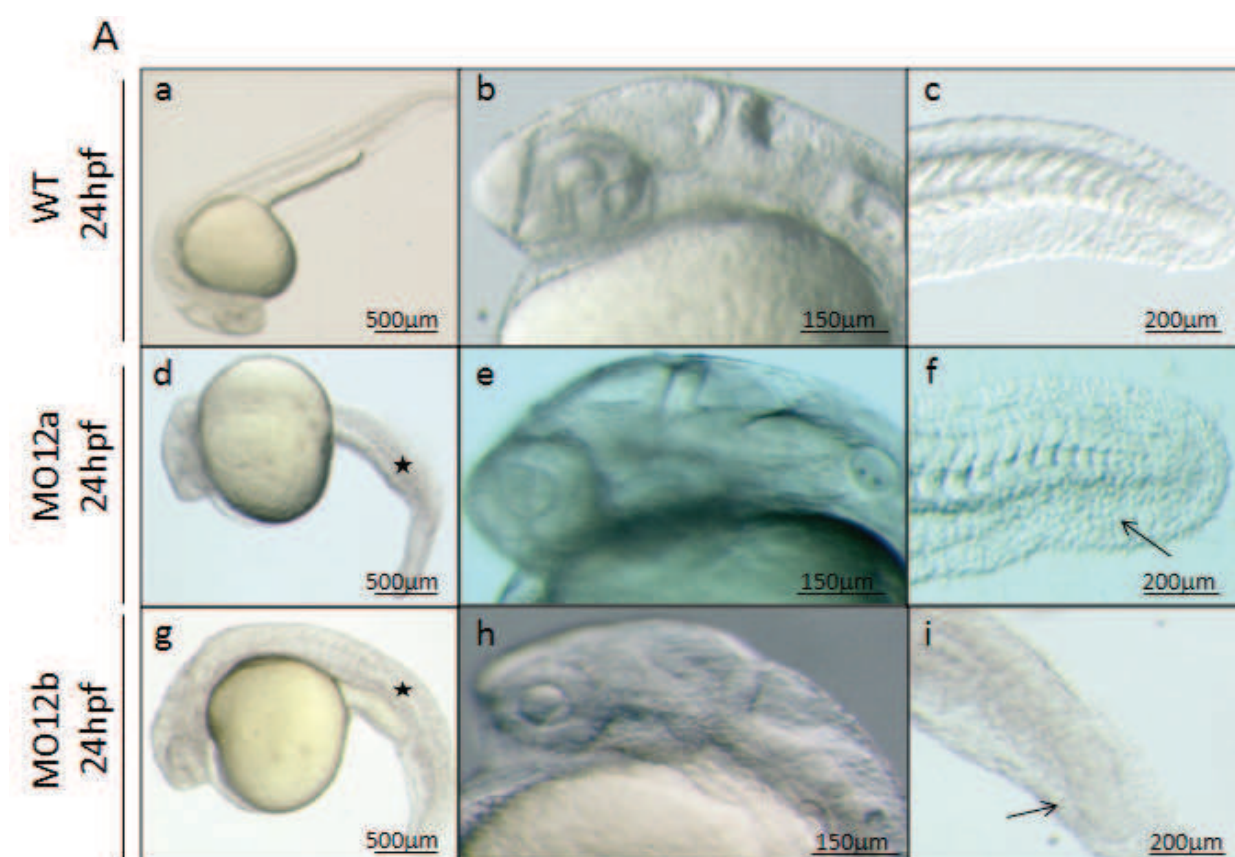


**Figure 26 : immuno-transfert réalisé avec l'anti-collagène XII sur extraits d'embryons sauvage(1) et injectés avec le MO12 (2) :** Les protéines totales sont séparées sur gel d'acrylamide 6% et révélées, après transfert sur membrane, avec l'anticorps anti-collagène XII. Deux bandes sont reconnues par l'anticorps : le collagène XII (flèche) et une bande de plus haut poids moléculaire qui n'a pas encore été identifiée (astérisque). Bader *et al.*, résultats non publiés.

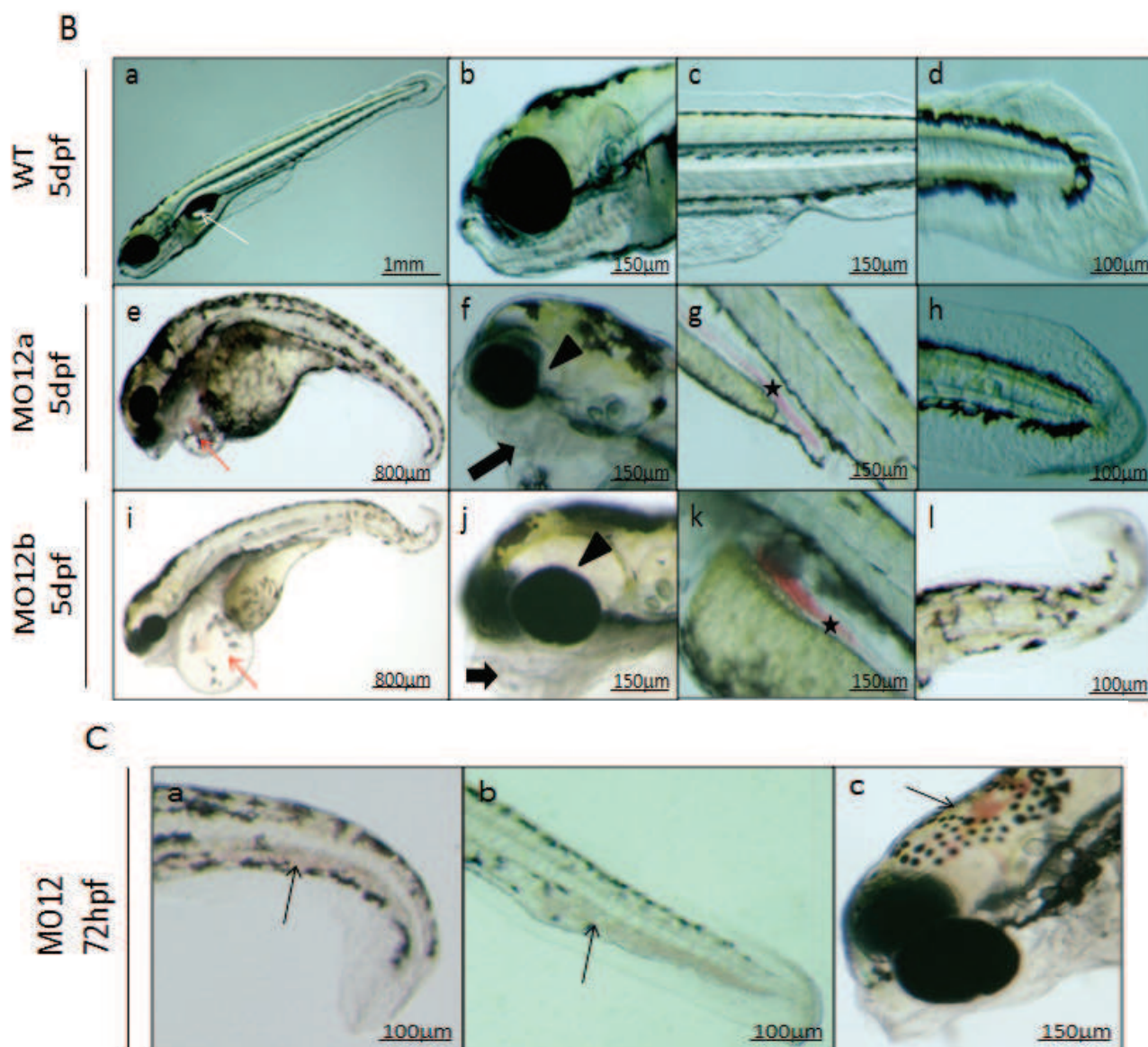
Afin de vérifier les résultats obtenus durant une première série d'expérience où le MO12b n'avait pas été testé, une nouvelle série d'injections des MO12a et MO12b a été effectuée. L'analyse phénotypique des morphants a été réalisée sur 500 embryons injectés avec le MO12a et 500 embryons injectés avec le MO12b. Le collagène XII étant exprimé à partir du stade 10 somites (Bader *et al.*, 2009), les embryons ont été observés entre 24hpf et



5dpf. Différentes concentrations de morpholinos ont été testées, les résultats obtenus confirment que la quantité optimale de morpholino à injecter est de 13ng. À cette concentration, les deux morpholinos donnent des morphotypes identiques, confortant leur spécificité (figure 27 A et B). La manipulation difficile des embryons très fragiles révèle un aspect peu cohésif des tissus à 24hpf, les animaux ne montrent que peu de mouvements. La queue est peu tonique et prend une forme incurvée à son extrémité (nageoire caudale) (figure 27 A). La notochorde n'est pas parfaitement rectiligne et le mésenchyme caudal semble moins bien organisé. En revanche, l'observation de la tête à 24hpf ne présente pas de défaut majeur,



**Figure 27 (suite page suivante): Analyse morphotypique des embryons injectés avec 13 ng de MO12a ou MO12b :** (A) Observation d'embryons de 24hpf, WT (a,b,c), MO12a (d,e,f) et MO12b (g,h,i). Les morphants MO12a (d) et MO12b (g) présentent le même morphotype : un aspect peu tonique, et une queue incurvée (astérisque). L'observation de la tête (b,e,h) ne montre pas de défaut particulier. L'observation de la queue (c ,f,i) montre une notochorde ondulée et une désorganisation partiel du mésenchyme caudale. Résultats non publiés.



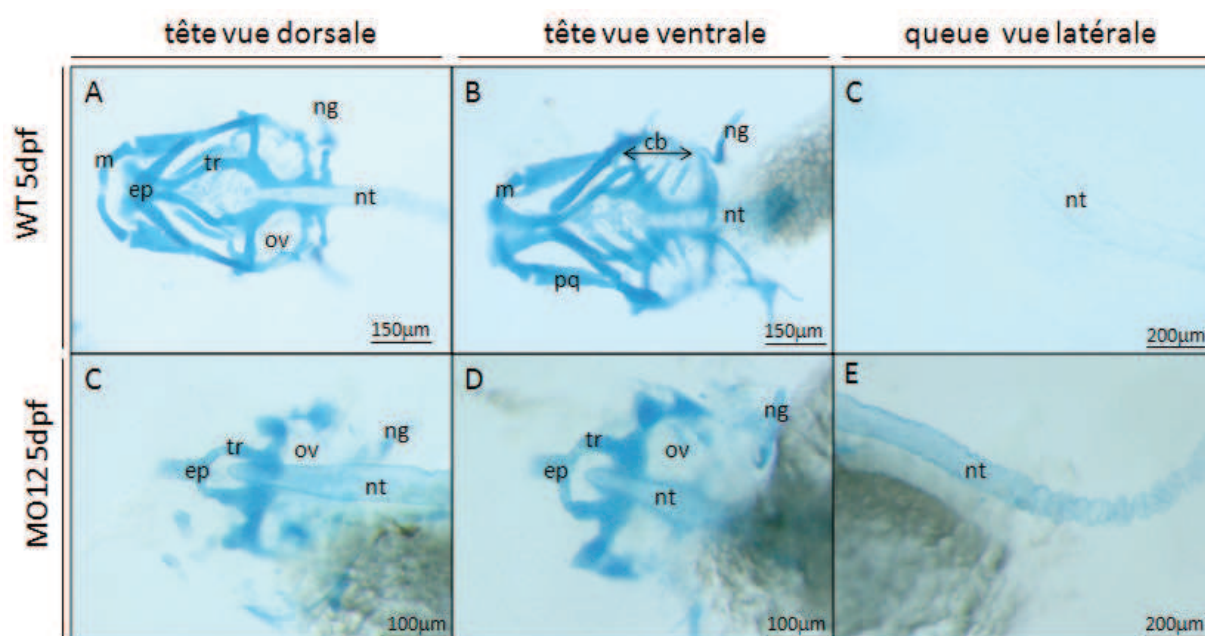


les yeux, l'encéphale et les vésicules otiques sont présentes et bien formés. Quelques rares points de nécrose ont toutefois été observés dans moins de 5% des poissons injectés (n=500). Ces observations corroborent nos premières observations. Il est également observé un gonflement de la vésicule péricardique et un cœur tubulaire, ces défauts sont communément retrouvés chez une grande diversité de morphants, cette atteinte pourrait ne pas être spécifique. En effet, l'injection de morpholinos induirait l'expression de p53, provoquant l'apparition de phénotypes non spécifiques (Robu *et al.*, 2007). La co-injection de morpholino p53 devrait éviter l'apparition de ce type de défauts.

De manière extrêmement reproductible, dès 48hpf, la nageoire caudale se replie sur elle-même en forme de « cuillère » (figure 27 B). A partir de 72hpf (figure 27 C), les cellules sanguines s'accumulent au niveau du retour veineux ventral, bloquant l'ensemble de la circulation sanguine. Il est parfois observé des hémorragies au niveau de la tête (20%). Après 5 jours de développement, les morphants MO12 présentent toujours une courbure de la queue et semblent moins toniques que les poissons sauvages. La morphologie des muscles est normale. Les myoseptes (horizontaux et verticaux) semblent peu atteints, ce qui peut paraître surprenant lorsque l'on prend en considération la forte expression du collagène XII chez les embryons sauvages dans ces structures (Bader *et al.*, 2009). On note également l'absence de la vessie natatoire chez les morphants. L'absence de nageoire pectorale précédemment observée n'a pas été confirmée dans cette étude mais des défauts morphologiques de cette structure ont parfois été observés (20%). À ce stade de développement, de sévères hémorragies sont observées dans l'intestin. L'injection du MO12 dans la lignée transgénique *Fli1-EGFP* (qui permet de suivre des cellules endothéliales par fluorescence) ainsi que des injections de chromophores vitaux (dextran-fire ou dextran rhodamine) dans la cavité cardiaque, permettrait certainement d'analyser avec plus de précision les défauts vasculaires induits. Les collagènes jouent un rôle crucial dans le développement et le maintien des vaisseaux sanguins, notamment les collagènes VIII et XIV (Plenz *et al.*, 2003).

L'analyse morphologique de la tête montre de sévères déformations avec des œdèmes autour des yeux. Pour mieux visualiser l'architecture du cartilage, une coloration des glycosaminoglycanes est réalisée au bleu Alcian à 5dpf. Les pièces cartilagineuses de la tête

des poissons sauvages sont bien développées et organisées (figure 28). Chez les morphants MO12, le développement du cartilage est fortement perturbé : Les arcs branchiaux et la mâchoire inférieure (cartilage de Meckel et le palatoquadrante) sont absents. La plaque éthmoïde et la trabeculea sont présentes mais atrophiées. Les structures des vésicules otiques sont localisables mais malformées. Enfin le développement des nageoires pectorales semble normal. Des observations antérieures (Bader *et al.*, 2009) montrent que le collagène XII n'est pas exprimé dans le cartilage mais dans le péricondre, structure, entourant les pièces cartilagineuses. Il est possible que la désorganisation de la matrice péricondrale en absence de collagène XII induise de sévères défauts de développement du cartilage. Il est également très intéressant de noter que, contrairement au poisson sauvage, la coloration au bleu Alcian persiste dans la notochorde des morphants MO12 après 48hpf ce qui suggère un défaut de maturation de cette structure. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en contrôlant les différentes étapes de différenciation des cellules de la notochorde, en analysant l'organisation du manchon périchordal par microscopie électronique à transmission ou encore en analysant l'expression de différents marqueurs de la notochorde (collagène II, marqueurs de la voie *Notch* ou *Shh* par exemple).



**Figure 28 : Observation du cartilage par coloration au bleu alcian :** L'observation en vue dorsale (A,C) ou ventrale (B,D) du cartilage chez les poissons sauvages de 5dpf. Clichés en vue latérale de la queue (C,E) ep : plaque éthmoïde ; tr : trabeculea, m : cartilage de Meckel, pq : palatoquadrante, cb : ceratobranchial, ov : vésicule otique, nt : notochorde, ng : nageoire.

L'extinction du collagène XII est efficace pendant 24h, indiquant que la ré-expression du collagène XII après 24h de développement ne permet pas de sauver le morphotype induit.

Les morphants sont difficilement manipulables et très fragiles, comme le patron d'expression pouvait le laisser penser. Le rôle du collagène XII dans la cohésion tissulaire expliquerait l'apparence des morphants. L'atteinte très généralisée des tissus chez le poisson zèbre rend difficile, voir impossible l'analyse du phénotype. Dans ce cas précis le modèle murin, chez qui l'expression du collagène XII est moins ubiquitaire, semble plus adapté à une étude fonctionnelle du collagène XII. Dans cette optique, une souris invalidée a été générée dans le laboratoire de M. Koch (Cologne). L'analyse du phénotype de ces souris permettra certainement une meilleure analyse de la fonction du collagène XII *in vivo*. Une autre stratégie consisterait à utiliser chez le poisson zèbre des morpholinos d'épissage qui ne cibleraient qu'un seul domaine du collagène XII et ainsi faire une étude fonctionnelle domaine par domaine qui induirait des morphotypes beaucoup plus fins et localisés.

## Publication III:

**Collagen XXII deficiency in zebrafish induces severe muscular dystrophy  
by disruption of the myotendinous junction**

Benjamin Charvet, Hannah Bader, Bruno Allard, Marilyne Malbouyres, Jörg Schulze, Catherine Monnot, Daniela Zwolanek, Elisabeth Vaganay, Manuel Koch and Florence Ruggiero

*Soumis pour publication*

## **Depletion of zebrafish Collagen XXII leads to muscular dystrophy by disrupting the myotendinous junction**

**Benjamin Charvet<sup>1</sup>, Jörg Schulze<sup>2</sup>, Bruno Allard<sup>3</sup>, Catherine Monnot<sup>4</sup>, Marilyne Malbouyres<sup>1</sup>, Daniela Zwolanek<sup>2</sup>, Elisabeth Vaganay<sup>1</sup>, Hannah L. Bader<sup>1</sup>, Manuel Koch<sup>5</sup> and Florence Ruggiero<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup> Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, ENS de Lyon, UMR CNRS 5242, Université Lyon 1, IFR128 Lyon Biosciences, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France.

<sup>2</sup> Center for Biochemistry, Medical Faculty of the University of Cologne, Germany

<sup>3</sup> Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire, et Moléculaire, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR 5123, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

<sup>4</sup> Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, CNRS UMR 7241/INSERM U1050 Collège de France, Paris, France.

<sup>5</sup> Institute for Oral and Musculoskeletal Biology, Department of Dermatology, Center for Molecular Medicine Cologne, Medical Faculty of the University of Cologne, Germany.

\* Author for correspondence

Dr Florence Ruggiero  
IGFL, UMR CNRS 5242  
ENS de Lyon – Site Monod  
46, Allée d'Italie  
69364 Lyon cedex 07  
Phone number: +33472722657  
Fax number: +33472722602  
e-mail: [florence.ruggiero@ens-lyon.fr](mailto:florence.ruggiero@ens-lyon.fr)

Short title: Collagen XXII is needed for stable muscle attachment

## Abstract

Collagen XXII (COLXXII) is a marker of tissue junctions whose function remains unknown. Here, we show that zebrafish COLXXII is expressed embryonically at the muscle cell extremities and deposited exclusively at the myotendinous junction (MTJ). Removal of COLXXII in zebrafish embryos results in a severe dystrophic phenotype including impaired swimming capacity, muscle weakness in response to electric stimulation, and down-regulation of Akt expression, a key factor of muscle growth induced by mechanical stretch. A defective interaction between the basement membrane and myoseptal collagen fibrils is observed resulting in MTJ disruption and muscle fiber detachment without sarcolemmal alteration. Repeated contractions induce massive muscle fiber detachment, a phenotype rescued by micro-injection of human COLXXII. Moreover, COLXXII expression appears to be regulated by Fgf8 signal emanating from myoseptum. Our data demonstrate that COLXXII is required for stable skeletal muscle attachment and formation of a functional MTJ identifying *COL22A1* as a candidate gene for one of the orphan muscular dystrophies in humans.



## Introduction

Complex and dynamic interactions between muscle sarcolemma and extracellular matrix (ECM) components are required for the initiation and maintenance of muscle fiber attachment to tendon. These interactions also mediate signal transduction events that are critical for muscle cell differentiation and physiology. The myotendinous junction (MTJ) is the major site of muscle force transmission to tendons. Two major mechanisms present at the MTJ connect and transduce contractile forces between muscle fibers and connective tissue across the sarcolemma: the dystrophin-associated protein complex (DAPC) and the  $\alpha 7\beta 1$  integrin. These two trans-sarcolemmal linkage systems bind to laminin 211, a basement membrane component. Mutations in genes encoding components of the linkage complexes result in muscle disorders (Cohn and Campbell, 2000). Mutations in the dystrophin gene cause Duchenne and Becker muscular dystrophies, while mutations in genes encoding components of the DAPC are responsible for some forms of limb girdle muscular dystrophies. Mutations in the integrin  $\alpha 7$  gene cause congenital myopathy (Hayashi et al., 1998) and mutations in the *LAMA2* gene result in the most common form of congenital muscular dystrophy MDC1A (Helbling-Leclerc et al., 1995). MTJ failure has not been reported in the context of muscle diseases though lack of one of the MTJ components should alter dramatically muscle cell anchoring to the tendon. Mice that lack dystrophin (*mdx*), laminin- $\alpha 2$  (*dy*) or integrin- $\alpha 7$  exhibit a reduction of membrane folds at MTJs (Desaki et al., 1992; Law et al., 1995 ; Miosge et al., 1999) but have not been reported to suffer MTJ failure.

With the generation (Granato et al., 1996) and characterization of mutants with impaired motility (review in Ingham, 2009), zebrafish is becoming instrumental in addressing the functional importance of MTJs in the context of muscle disease. In zebrafish, somitic muscle fibers differentiate to span the entire myotome and vertical myosepta, which are functionally equivalent to the mammalian tendon, serve as attachment sites. Muscle cells thus directly attach to the extracellular sheet of the myosepta that form the MTJ also called the somite boundaries. Myosepta serve as the transmitter of muscular contractility to the notochord and are indispensable for zebrafish larval movement. The dystrophin mutant *sapje* (*sap*) demonstrated that dystrophin is essential for maintaining the integrity of the sarcolemma at the MTJ (Basset and Currie, 2003). A second mutant, *candyfloss* (*caf*), that harbors a mutation in the *lama2* gene,

is characterized by muscle fiber detachment from the MTJ without sarcolemmal rupture (Hall et al., 2007). Recently, the dystrophic mutant *softy* (*sof*) that harbors a mutation in the laminin  $\beta 2$  (*lamb2*) gene has been described (Jacoby et al., 2009). Like the *sap* and *caf* mutants, the *sof* mutants displayed severe muscle degeneration resulting from MTJ failure.

Collagens represent a super family of extracellular matrix proteins which are both structural and instructive proteins (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). Collagen XXII (COLXXII) belongs to the FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helice) subset of the collagen superfamily which members are known to associate with collagen fibers and to mediate protein-protein interactions. It is composed of a N-terminal non-collagenous (NC6) domain with a von Willebrand factor A-like (vWA) domain placed next to a Thrombospondin N-terminal like (TSPN) domain and a long collagenous domain with several interruptions (COL1-COL6). COLXXII has been identified as a marker of tissue junctions (Koch et al., 2004); however, its *in vivo* function is unknown.

Here, we took advantage of the zebrafish model to decipher the *in vivo* function of COLXXII. We showed that COLXXII is a novel, non redundant protein involved in the formation of stable skeletal muscle attachment and in the development and maintenance of functional MTJs. Several mutations in ECM genes have been associated with myopathies (Lisi and Cohn, 1997). The genetic heterogeneity of the disorders suggests that other matrix proteins could account for unresolved cases. Our results demonstrate that COLXXII plays a crucial role in muscle homeostasis and therefore represents a candidate gene for muscular dystrophies.

## Results

### zebrafish *Col22a1* presents the overall structure of its mammalian counterparts

A zebrafish ortholog of the human COL22A1 gene is available in the CoreNucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). It has been located on chromosome 19 and the newest prediction of the zebrafish collagen XXII  $\alpha 1$  chain is incomplete. However, the previous prediction (XM\_685915 version GI:189532156) corresponds well to the human and mouse collagen XXII  $\alpha 1$  chain. The zebrafish protein, 1409 amino acids in length, has an overall structure similar to the mammalian counterpart (Figure 1A) with the presence of 5 collagenous domains (COL1-COL5) interrupted by 6 non-collagenous domains: 5 linker regions (NC1-NC5) and a conserved NC6 domain at the N-terminal extremity formed by a vWA domain followed by a TSPN domain. The structural signature of the FACIT collagens is conserved: a double short interruption in the COL2 domain and the presence of a conserved CXXXXC motif at the NC1-COL1 junction domain (Figure 1A). Alignment of the N-terminal non-collagenous domain of the zebrafish collagen XXII  $\alpha 1$  chain and the human collagen XXII  $\alpha 1$  chain (NM\_152888) revealed an overall 66% identity and 81% similarity. Both domains, the vWA (67% identity and 81% similarity) and the TSPN domain (81% identity and 87% similarity) are highly conserved. Furthermore, the linker region NC2, which contains a coiled-coil domain, exhibits 69% identity and 91% similarity between humans and zebrafish.

### *Col22a1* is expressed in skeletal muscle cells and the protein is deposited at the MTJ in developing zebrafish

To determine the spatiotemporal expression pattern of *col22a1* in developing zebrafish, whole mount in situ hybridizations were performed (Figures 1B-1F). *Col22a1* expression was detected at 22 hours post-fertilization (hpf) as a diffuse signal in developing somites (not shown). Signal in the somites intensified at 24 hpf (Figure 1B) but myoseptum, the structure analogous to mammalian tendon, was not labeled (Figure 1B). Progressively, *col22a1* mRNA signal became more intense at the muscle cell extremities close to the myoseptum (48 hpf, Figure 1D) and was clearly restricted to the muscle cell extremities with no signal in the myosepta at 72 hpf (Figures 1E, 1F). *Col22a1* expression was detected by RT-PCR slightly earlier than by *in situ* hybridizations (18h vs 22h), with a substantial increase at 22 hpf (Figure S1).

Spatiotemporal expression of extracellular protein transcripts does not necessarily match protein localization. We thus generated rabbit polyclonal antibodies against zebrafish COLXXII vWA domain recombinantly produced in HEK-293 cells and characterized to immunolocalize the protein in zebrafish with whole mount confocal immunofluorescence stainings (Figure S1). The protein was detected at 26 hpf, as a fuzzy staining in the myotomes, with a more intense staining along the myosepta (Figure 1G). At 48 hpf and 72 hpf (Figures 1H, 1I), the signal disappeared from the myotomes and a robust expression was instead detected in vertical myosepta throughout the trunk of embryos. Adult cross-sections showed that COLXXII persists throughout the zebrafish lifespan (Figure S1). In mammals, COLXXII is expressed at the MTJ (Koch et al., 2004). The MTJ forms a very thin structure particularly in zebrafish embryos and it was difficult to ascertain its localization with immunofluorescence staining. In zebrafish, dystrophin is enriched at the MTJ, and thus represents a good marker of the junction. Double immunostaining with monoclonal anti-dystrophin antibody and COLXXII antibodies of 72 hpf embryos revealed a co-localization of the two signals at the resolution of confocal microscopy (Figures 1J-1L) indicating that COLXXII is deposited at the MTJ. We conclude that at 48 hpf, when extensive embryo movements are observed, COLXXII has incorporate the MTJ extracellular matrix.

### **Loss of COLXXII affects muscle contractile performance and down regulates Akt expression and activation**

The *in vivo* function of COLXXII was assessed through morpholino-mediated knockdown. The specificity of the non-overlapping morpholinos (MO22a and MO22b) was assessed by immunofluorescence and Western-blot analysis (Figures 2A, 2B). No protein was detected in 48 hpf embryos injected with 8.5 ng of morpholinos with both methods whereas the protein was detected in 5-base mismatch-injected embryos and wild type controls. The gross phenotype of MO22a and MO22b-injected embryos and larvae was indistinguishable. Injection of MO22a or MO22b at the 1-2 cell stage resulted in identical defects in the morphology of the embryos: curvature of the trunk and of the tail (Figure 2C) and U-shaped somites (Figure 2D). Moreover, MO22 embryos showed defects in hatching and the chorion of the morphants often needed to be removed manually. MO22 larvae displayed swim failure and motility impairment after touch stimulation as visualized by video microscopy (Figure 1E, Video1). Statistics and phenotype classes according to their severity are given in Supplemental Experimental Procedures.

The repercussions of *col22a1* knockdown on skeletal muscle contractile performance were investigated by comparing the amplitude of single twitch contractions in response to supramaximal electric stimulations in 5 days post fertilization (dpf) wild type and MO22-injected larvae. Figure 3A shows that repeated twitch contractions exhibiting stable amplitudes could be elicited in wild type larvae. The contractile force was considerably decreased in MO22-injected larvae (Figure 3B) and in average the mean amplitude of the twitch response was significantly lower in MO22-injected as compared to wild type animals (Figure 3C). We conclude that loss of *col22a1* expression in zebrafish results in large muscle weakness.

In zebrafish, at 26 hpf, e.g. after the onset of COLXXII expression, the axons of the motor neurons start migrating along the vertical myoseptum to form synaptic contacts with muscle fibers (Lewis and Eisen, 2004). We reasoned that loss of COLXXII might affect growth and pathfinding of axons. We thus performed immunofluorescence staining with ZN8 antibodies, a zebrafish neuronal marker. At 26 hpf, the three motor-neurons were present and the axon projection started to migrate along the vertical myosepta in MO22-injected and wild type embryos (Figure S2). At 72 hpf, when morphants display important muscle fiber detachment, motor neuron axons were shorter and irregular compared to controls. We conclude that muscle weakness is not primary associated with motor neuron activity deficiency.

*In vivo*, skeletal muscles are subjected to mechanical forces; we postulate that loss of muscle contraction in MO22-injected embryos may alter signaling pathways. Akt and ERK1/2 are downstream of two distinct mechanosensitive signaling pathways and have been recently reported to be activated in skeletal muscle by mechanical forces (Mohamed et al., 2010). We thus investigated expression and phosphorylation of Akt and ERK1/2 in embryos at 28 hpf, corresponding to the onset of embryo movement, and at 48 hpf when embryo movements within the chorion increase considerably. Figure 3F shows that ERK1/2 protein expression and activation is unchanged in MO22-injected embryos compared to wild type. A strong increase in Akt expression and activation was observed in protein extracts of 48 hpf wild type embryos compared to 28 hpf embryo extracts probed with antibodies against the Akt protein and its phosphorylated form (Figure 3E). In striking contrast, no increase in Akt expression was detected in MO22-injected embryo extracts. However, a weak but sustained phosphorylation of Akt was observed in protein extracts of 28 and 48 hpf MO22-injected embryos (Figure 3E). We

conclude that Akt expression correlated with increased embryo movements. Absence of movement in MO22-injected embryos might result in a deregulation of the Akt pathway leading to the inhibition of Akt expression and subsequent reduction of activation.

### **MO22-injected larvae displayed a dystrophic phenotype resulting from massive muscle fiber detachment without sarcolemma damage**

The restricted location of COLXXII led us to investigate whether muscle weakness was caused by defects of the MTJ. The first myotomal lesion (U-shape somites, Figure 2D) was observed at the time of hatching (around 72 hpf). At 96 hpf, muscle cell detachment and retraction from the vertical myosepta was clearly observed by light microscopy (Figure 4B). Challenging MO22-injected larvae with electric stimulations or by stimulating them to swim through viscous medium led to a considerable increase of the severity of the detachment phenotype (not shown). To analyze whether the two major muscle fiber types were similarly affected in morphants, we used markers to slow (S58) and fast (F59) muscle cells respectively. By 16 hpf, the first somitic muscle cells to differentiate are slow-twitch fibers that subsequently migrate to the lateral periphery of the somites. Fast-twitch muscle fibers then develop and occupy the main part of the somite (Bassett and Currie, 2003). We showed that both cell type detach from myosepta of 72 hpf MO22-injected embryos (Figures 4D, 4F). The integrity of muscle fibers still attached to MTJ was attested by the absence of acridine orange staining in myotomes (Figure 4G) as in wild type (Figure 4H). By contrast, all retracted fibers stained with acridine orange indicating that cells underwent apoptosis only after they detach (Figure 4H, asterisk).

To analyze the cause of the muscle fiber detachment and the disorder of the MTJ connection, we performed confocal immunostaining with different markers of the MTJ (laminin), muscle fibers (dystrophin,  $\alpha$ -actinin) and myosepta (collagen XII; Bader et al., 2009). Expression of all markers was maintained in MO22-injected embryos (Figures 4J, 4L, 4N). Inversely, expressions of COLXXII and COLXII proteins were not affected in the *sapje* mutant (*sap*) that has a mutation in the dystrophin gene (Figure 4P, 4R) compared to wild type (Figure 4O, 4Q). However, double immunostaining with laminin (red) and  $\alpha$ -actinin (green) antibodies revealed that lack of COLXXII expression leads to defects in myoseptum formation. The myoseptal structure of 4 dpf MO22-injected larvae was distorted, irregular and disrupted in several places



(Figures 4J, 4L compared to 4I, 4K). Rupture of the myoseptum was attested by the presence of giant muscle fibers that spanned two adjacent myotomes at myoseptal tear sites (Figure 4J). Large myotomal lesions generated by multiple retracting muscle fibers were observed in MO22-injected larvae immunostained with dystrophin antibodies (Figure 4L compared to 4K). Interestingly, retraction of laminin epitopes with the muscle fibers was observed in several areas (Figure 5J, insert) indicating that disruption occurred at the basement membrane/myoseptal extracellular matrix interface. Consistent with this observation, dystrophin was also retained at the retracted sarcolemma (Figure 4L). In contrast, the tendon marker collagen XII, whose expression is not affected in MO22-injected embryos, remained at the myosepta after muscle fiber detachment (Figure 4N). More nuclei (in blue) were observed in the myosepta of morphants compared to WT (Figures 4M, 4N), indicating fibroblast invasion in damaged myosepta.

To detail the site of the MTJ rupture, we performed transmission electron microscopy (TEM). Myosepta consist of tightly packed collagen fiber bundles arranged into oblique arrays which provide tight anchorage of the muscle sarcolemma to the myoseptum through the MTJ basement membrane (Figure 5A) and allow the undulating movement during fish swimming. In striking contrast, the myoseptal structure of 5 dpf MO22-injected larvae appeared distorted and distended. Tearing of the myosepta could be seen. Collagen fibrils were sparse and formed loose unorganized bundles (Figures 5B, 5C, 5D). Interestingly, whereas rare fibroblasts were observed in the compact myosepta of wild type larvae (Figure 5A), numerous fibroblasts have invaded the myosepta of MO22 injected larvae (Figures 5B, 5C) confirming nucleus staining in Figure 4M. Gaps were often seen corresponding to muscle fiber detachment and retraction (Figure 5B, asterisk). These damages caused by the loss of COLXXII expression were evident in histological sections (Figure 5F compared to wild type Figure 5E). Muscle fibers remaining attached to the myosepta displayed normal morphology and appeared well differentiated. The contractile system and the sarcolemma were unaffected. Hence, loss of COLXXII expression did not affect proper muscle cell differentiation but compromised muscle fiber attachment to myosepta that detached and retracted when submitted to contractile activity. The ultrastructure of the basement membrane appeared normal indicating that COLXXII is dispensable for basement membrane formation (Figure 5D, arrows). TEM observations allowed us to confirm that the rupture occurs between the outer surface of the basement membrane of muscle fibers and the myoseptal collagen fibrils without compromising the sarcolemmal integrity and attachment to the basement

membrane (Figures 5C, 5D). In agreement with this observation, the continuous basement membrane sheet connecting muscle fibers to myosepta was interrupted at detachment sites (Figure 5B, asterisk). We conclude that COLXXII provides a structural link between the outer part of the basement membrane and the myoseptal collagen fibrils as illustrated in Figure 5G. COLXXII comprises an N-terminal vWA domains (vWA) that are known to mediate protein-protein interactions, and collagenous domains (COL) that are known to associate with collagen fibrils. In MO22 embryos (MO22), rupture occurs between basement membrane and tendon collagen fibrils following muscle contractile activity provoking muscle fiber detachment. The muscle detachment phenotype (dystrophic phenotype) was similarly reported in *sap* (dystrophin) and *caf* (laminin  $\alpha 2$ ) mutants.

### **The muscle fiber detachment phenotype is rescued by micro-injection of human COLXXII protein**

Our functional analyses indicate that COLXXII provides a structural link between the basement membrane of muscle fibers and the extracellular matrix of myosepta; additionally, vWA-like domains are involved in protein-protein interactions. To investigate whether injection of COLXXII protein or domain can rescue the MO22-injected embryo phenotype, we used different protocols of co-injection of the purified recombinant zebrafish vWA domain and the human full-length COLXXII protein. Both proteins were produced in 293-HEK and purified to homogeneity from conditioned media (Figure S1). Different quantities of the recombinant domain were co-injected with 8.5 ng MO22b morpholino into 1-cell stage embryos. A significant rescue of the muscle fiber detachment phenotype and swimming behavior (Figure 6A, Video 2) was achieved by co-injecting 8.5 ng of MO22 with 0.32 ng of the recombinant zebrafish domain or 0.16 ng of the human COLXXII. Incomplete or no rescue was obtained with decreased quantities of injected recombinant proteins (not shown). Injection of increased quantities (from 0.8 ng to 0.32 ng) of the recombinant proteins had no effect on embryo development and appeared not to be toxic (data not shown). As another control, co-injection of MO22 with an irrelevant recombinant TSPN domain and, conversely, co-injection of an irrelevant MO (MO11a1; Baas et al., 2009)

with the recombinant vWA domain did not rescue the respective phenotype of the injected embryos (data not shown). The rescue of the muscle detachment phenotype was attested by staining actin in muscle fibers of 72 hpf wild type (Figure 6B) and embryos injected with MO22 (Figure 6C), vWA-MO22 (Figure 6D) and COLXXII- MO22 (Figure 6E). Only the MO22-injected embryos showed a muscle fiber detachment phenotype (Figure 6C). The myotome structure of embryos co-injected with MO22 and either the vWA domain or the full-length protein appeared similar to the wild type (Figures 6D, 6E compared to 6C). Fish musculature was then challenged by applying repeated electric shocks to 72 hpf wt (Figure 6F), MO22-injected embryos (Figure 6G) and rescued embryos (Figures 6H, 6I). Interestingly, electric stimulation resulted in an alteration of muscle attachment in embryos co-injected with the vWA domain (Figure 6H), whereas embryos injected with the entire human COLXXII remained unaltered (Figure 6I). Overall, the results showed that only the injection with the full-length protein showed a complete functional rescue of the muscle attachment phenotype.

### **FGF signaling is required for expression of COLXXII**

The molecular mechanisms underlying muscle and tendon interactions have been shown to involve different members of the fibroblast growth factor family (FGF) (Edom-Vovard and Duprez, 2004). *Fgf4* expression is required for the maintenance of the tendon markers scleraxis and tenascin, but not for *Fgf8* expression in tendons (Edom-Vovart et al., 2002). RT-PCR analysis of total RNA from various developmental stages of zebrafish embryos showed that *Fgf4* expression starts just after COLXXII expression onset (24hpf vs 22 hpf) (Figure 7A, left panel). We thus investigated whether FGF signaling may regulate COLXXII expression. With this aim, 18 hpf embryos were raised in the presence of an inhibitor of FGF signaling, SU5402 and maintained in the presence of the inhibitor during 8, 12 or 24 hrs. Confocal immunofluorescence labeling with COLXXII antibodies showed that expression of COLXXII is considerably decreased in treated animals (Figure 7D) compared to controls (raised in 2% DMSO) (Figure 7B). Expression of the COLXII tendon marker was unaltered in treated animals (Figure 7E) compared to controls (Figure 7C). Interestingly, 72 hpf embryos treated with SU5402 (Figure 7F) that showed substantial decrease in COLXXII expression (Figure 7D), displayed a similar phenotype as MO22-injected embryos (Figure 7G), curvature of the tail (not shown), U-shape somites and muscle attachment defects (Figures 7F, 7G, arrows). Moreover, acerebellar (*ace*), a zebrafish *Fgf8* mutant (Reifers et al., 1998) showed significant decrease in COLXXII expression

(Figure 8B compared to 8A, wild type). Finally, no change in *Scx* and *Fgf4* expression was observed in MO22-injected embryos extracts as analyzed by RT-PCR (Figure 7A, right panel). Only a slight decrease in *Fgf8* expression was observed concomitantly with the onset of *col22a1* expression in MO22-injected embryos (Figure 7A, right panel). At 22 hpf, *Fgf8* is expressed in presomitic mesoderm (Figure C and D) and the signal switches to anterior myosepta (Figure C and F) as somites differentiate. Signal is detected in all myosepta at 26hpf (Figure F). We thus propose that COLXXII expression is mediated by Fgf8 signal emanating from myosepta.

## Discussion

In this paper, we have characterized the zebrafish ortholog of the human *COL22A1* gene and ascertained its expression pattern during zebrafish development. We showed that COLXXII is expressed by skeletal muscle cells in response to Fgf signals and deposited exclusively at the MTJ. Moreover, our data provide the first evidence of the *in vivo* function of this new FACIT collagen. Using morpholino-knockdown, we demonstrate that skeletal muscle attachment and MTJ integrity critically depends on COLXXII expression, identifying *col22a1* as a potential candidate gene for one of the unresolved congenital muscular dystrophies in human.

The morphogenesis of the MTJ remains elusive. The molecular mechanisms underlying muscle and tendon interactions involve the fibroblast growth factors Fgf4 and Fgf8 (Edom-Vovard and Duprez, 2004). The unique location of COLXXII at the interface between tendon and muscle suggests that its formation may depend on signals emanating from neighboring tissues. The temporal and spatial expression of Fgf4 at the muscle fiber extremities where tendon attach (Edom-Vovart et al., 2002) is similar to *Col22a1* expression in mice and zebrafish (Koch et al., 2004; present study), suggesting that their expressions are correlated. *Fgf8* transcripts are expressed by tendon cells that are near the muscle once tendons have formed their attachment in chick embryos (Edom-Vovard et al., 2001) and in zebrafish embryos at 22 hpf (Reifers et al., 1998, present study). Regarding their unique expression pattern at the myotendinous interface, Fgf4 (muscle) and Fgf8 (tendon) are good candidates to be the molecular factors responsible for the initiation and/or maintenance of *col22a1* expression in muscles. The role of Fgf8 in the musculo-skeletal formation is not elucidated. Fgf4 is required for the maintenance of the tendinous markers, scleraxis and tenascin but not Fgf8 (Edom-Vovart et al., 2002). Using Fgf signaling inhibitor and the *ace* (*fgf8*) mutant, we have identified Fgf8 as a molecule actor in the expression of the myotendinous marker *Col22a1* in muscle. These provide the first evidence for a requirement of communication between muscle and tendon through Fgf signaling for expression of the MJT marker *Col22a1* that is critical for its function. Fibroblast growth factors are involved in the regulation of ECM protein expression and are presumed to be necessary for tissue repair. Recently, Fgf2 was shown to upregulate the tendon marker Scleraxis in mesenchymal fibroblasts with a potential in tendon and muscle repair (Ker et al., 2011).

Previous work has identified a small class of « dystrophic » mutants characterized by more or less severe embryonic muscle degeneration as a result of muscle attachment failure. Lack of the novel MTJ component COLXXII results in a phenotype similar to that previously reported for the *sap* (dystrophin), *caf* (laminin  $\alpha 2$ ) and *softy* (*sof*) « dystrophic » mutants (Basset et al., 2003; Hall et al., 2007 ; Jacoby et al., 2009), all components of muscle linkage systems present at the MTJ. A distinctive feature of the *sof* mutant which corresponds to a missense mutation in the laminin  $\beta 2$  (*lamb2*) gene, is that *sof* animals are able to recover and survive to adulthood despite muscle detachment (Jacoby et al., 2009). In addition, the knock-down of zebrafish integrin  $\alpha 7$  (*itga7*) and integrin-linked kinase (*ilk*) that are both enriched at the MTJ was shown to be critical for mechanical stability in skeletal muscles (Postel et al., 2008). *Col22a1* morphants partially phenocopy the *sap* and *ilk*-deficient lost-contact (*loc*) mutants. Contrary to *loc* and *sap* that displayed muscle detachment from day 4-5 long after the formation of the MTJ (Postel et al., 2008), onset of muscle detachment was observed at day 2 in *Col22a1* morphant embryos. In addition, contrary to *sap* mutants, no sarcolemmal rupture was observed in *Col22a1* morphants. Muscle cell apoptosis visualized by acridine orange staining was only observed in detached and retracted muscle cells. In that, COLXXII knockdown caused a phenotype more similar to that seen in the *caf* mutant (Hall et al., 2007) or in *itga7* morphants (Ingham, 2009) in which muscle detachment is caused by cell detachment without sarcolemma rupture and starts at day 1.5 and day 2 respectively. Moreover, muscle detachment in *caf* mutant is enhanced by mechanical stress (Hall et al., 2007) as observed in COLXXII depleted larvae in which challenging contractile force in response to electric stimulation induced massive muscle cell detachment. The fact that *col22a1* morphants phenocopy the *caf* mutants indicate that the two proteins (laminin  $\alpha 2$  and COLXXII) interact *in vivo*. Loss of expression of all proteins involved in the two major muscle linkage systems display similar phenotypes (Parsons et al., 2002; Basset et al., 2003; Guyon et al., 2005; Hall et al., 2007; Postel et al., 2008; Ingham, 2009; Jacoby et al., 2009). The muscle detachment phenotype in *loc/ilk* mutants appeared late compared to the *caf* mutants likely due to a redundancy of the integrin linkage system with the DAPC complex acting in parallel (Postel et al., 2008; Hall et al., 2007). In contrast, COLXXII appears to be a critical, non-redundant component of the MTJ involved in skeletal muscle attachment and maintenance of the MTJ.

The unique location of COLXXII at the interface between the outer surface of basement membrane and the surrounding extracellular matrix (Koch et al., 2004) can explain the strong



myoseptal phenotype observed in *Col22a1* morphants that was not described in any members of the « dystrophic » mutant class. The abnormal low density of collagen fibrils observed in the myoseptum of morphants is likely to render the MTJ weak, predisposing it to subsequent tears. It has been shown that somite boundaries function to limit muscle fibril elongation (Henry et al., 2005). Interestingly, here we confirmed this observation since giant fibers were observed in myotomes of *Col22a1* morphants at sites of myosepta interruptions. Here we also reported that loss of COLXXII expression leads to muscle weakness. No alteration of skeletal muscle differentiation and of the contractile apparatus was observed with TEM. Skeletal muscles are subjected to mechanical forces *in vivo* and we postulated that the muscle detachment in MO22-injected embryos alter mechanosensitive signaling pathway. Along this line, it has been recently reported that longitudinal stretch activated Akt whereas transverse stretch activated ERK1/2 proteins (Mohamed et al., 2010). In agreement with these findings, we found that, in wild type embryos, Akt expression, but not ERK1/2, is strongly increased at 48 hpf, when muscle contractile activity intensifies. Such an increase was not observed in 48 hpf MO22-injected embryos probably as a consequence of muscle weakness of the morphants. Since Akt activity is a critical regulator of skeletal muscle mass and contractile performance (Wu et al., 2011), lack of a positive feed-back loop could therefore contribute to the dramatic muscle weakness observed in MO22-injected zebrafish. It would be interesting to investigate whether Akt expression and activity is also altered in all dystrophic mutants.

As demonstrated with TEM in *Col22a1* morphants, rupture occurs between the MTJ basement membrane and the fibrillar collagen network of the myosepta/tendon. In agreement with this observation, immunofluorescence analysis showed that the laminin epitopes retract with detached muscle cells. These data, along with the fact that *Col22a1* morphants phenocopy the *caf* mutants, strengthen the hypothesis that COLXXII provides a structural link between MTJ basement membrane and the myoseptal collagenous network through interaction with laminin  $\alpha 2$ . COLXXII belongs to the FACIT subset of the collagen superfamily. Very little is known about their *in vivo* function but they are commonly characterized by their capacity to associate with collagen fibers through their C-terminal (COL1-COL2) collagenous domains and to mediate protein-protein interactions through their N-terminal non-collagenous domains (review in Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). Partial rescue was observed by co-injecting the recombinant vWA domain of zebrafish COLXXII with MO22. vWA domains are generally

involved in protein-protein interactions *via* their MIDAS motif (Whittaker and Hynes, 2002). This motif can bind the basement membrane components laminin and collagen IV (Bell et al., 2001). Micro-injection of zebrafish vWA domain partially restored the muscle attachment phenotype whereas MO22 phenotype rescue is obtained with micro-injection of the entire human COLXXII protein. Altogether, our data suggest that the vWA domain of COLXXII binds to laminin  $\alpha 2$  likely through its EGF-like domains whereas the collagenous domains bind to tendon collagen fibrils (Figure 5G). The partial rescue obtained with vWA domain can be explained by the fact that the N-terminal domain of COLXXII can bind to other intermediate ECM bridging molecules. Nevertheless, we cannot completely exclude that COLXXII directly binds to integrin  $\alpha 7 \beta 1$  since direct cell adhesion to human COLXXII through integrin binding has been reported (Koch et al., 2004).

As muscle cells differentiate, they are surrounded by a specialized ECM that plays an important role in the musculoskeletal formation and physiology. Our data place COLXXII as a pivotal component of the two major linkage systems in muscle. The number of causative extracellular matrix genes associated with muscular dystrophies is expanding (Lisi and Cohn, 2007), and zebrafish have been used as an outstanding model for this group of disorders (Ingham, 2009). Our data identify the extracellular matrix gene *col22a1* as a novel candidate gene for one of the several muscular dystrophies in human. The fact that injection of the human COLXXII protein rescued the muscle attachment phenotype of MO22-injected embryos argues in favor of a similar role of COLXXII in humans.

## Material and Methods

### *Zebrafish strains, maintenance and specific treatments*

AB/TU wild-type and *sapje* mutant (*sap*<sup>ta222a</sup>) maintenance, embryo collection and staging were carried out at the zebrafish facilities using established protocols (Bader et al., 2009) (PRECI, IFR 128 Lyon Biosciences Gerland). The developmental stages are given in hour post-fertilization (hpf) and day post-fertilization (dpf) at 28.5°C, according to morphological criteria. From 48 hpf, embryos used for experiments were treated with phenylthiourea (PTU, Sigma P7629) to prevent pigmentation. When indicated, 18 hpf embryos were incubated for 4, 8, 12 and 22 h without

(control) or with 25  $\mu$ M FGFR inhibitor SU5402 in Danieau's solution containing dimethylsulfoxide (DMSO) (solution used for dissolution of the drug). *Ace* mutant embryos were obtained from the Center for Developmental and Biomedical Genetics (University of Sheffield).

### *Morpholinos*

Two morpholinos (MO) were designed with sequences complementary to the *col22a1* cDNA in non-overlapping regions just upstream to the initial start codon (Gene Tools). The sequences of the *col22a1* morpholino antisense oligonucleotides used in this study were: MO22a 5'-CATGAAGTTGCTGCTCCTGTGGAGA-3', MO22b 5'-CTTGAGCCCAAATCGAAACTCCATC-3'. The morpholino control MS22 corresponds to the MO22b sequence containing five base mismatches (in bold) 5'-CTTCAGGCCCAAATGGAAAATCAATC-3'. 1- or 2- cell stage embryos were injected with different quantities of morpholinos (4.25ng to 20 ng) in 1X Danieau (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM Hepes pH 7.6). Based on these data, 8.5 ng of morpholinos MO22a, MO22b and MS22 were injected in all experiments. Embryos were injected with phenol red diluted in Danieau (1:5) to monitor the success of the injection and even distribution in the embryos. The morphological and phenotypic observations of morphants were observed with a stereomicroscope or a light microscope (all from Leica) equipped with a digital camera. MO-injected embryos were compared to MS22-, phenol red- and non-injected embryos. More than 80% of MO22-injected embryos displayed similar defects (Table S1, statistics from 10 different micro-injections of about 300 embryos each).

### *Whole-mount in situ hybridization*

Whole-mount in situ hybridizations were performed as previously described (Bader et al., 2009). Riboprobes for zebrafish *col22a1* were localized in the sequence corresponding to the vWA (537 bp) and the TSPN (675 bp) domains. The following primers were used to amplify the probe from 24hpf zebrafish cDNA: *Col22a1* vWA forward 5'-TGTAAGAACGTCCACTATGATC-3' *Col22a1* vWA reverse 5'-CCTGATCTTGTCGATGGCGTCA-3', *Col22a1* TSPN forward 5'-CCCAAAGCGCTCATGTCTTCC-3' and *Col22a1* TSPN reverse 5'-CATAGGAACGCTGTCATAGAGCC-3'. Stained embryos were observed with a stereomicroscope or a macroscope (all from Leica) both equipped with a digital camera.

### *Production and purification of recombinant proteins and generation of polyclonal antibodies to zebrafish COLXXII*

The N-terminal sequence of collagen XXII was amplified on zebrafish cDNA using degenerated primers (forward 5'-GAYCTGGYCTTYMTCCTGGACAC-3' and 5'-ACRTGGAAGACRTGNGCNSWCTT-3'). The sequence of the clone was compared with the predicted coding sequence from the genome sequencing consortium (100 % identical). For the generation of the recombinant vWA zebrafish domain, the coding sequence was amplified (forward 5'-CACGCTAGCCAAAGAGCAGGTTGTAAGAACGTCC-3' and reverse 5'-GTGGGATCCCTTACCTGATCTTGTCGATGGCGTCAAAG-3') and cloned into our PCEP (Invitrogen) modified expression vector (Koch et al., 2004). Expression, purification and the generation of a polyclonal antibody were performed accordingly (Koch et al., 2004). For the rescue experiments, the full-length human collagen XXII protein was injected (Koch et al., 2004).

### *Immunofluorescence staining and confocal microscopy*

Staining was performed as previously described (Bader et al., 2008). Briefly, embryos were fixed for 3h at room temperature or overnight at 4°C in PBS, pH7.4, with 4% Paraformaldehyde (PFA) and used for immunostaining or stored until used at -20°C in methanol. Permeabilization was obtained by incubating embryos in acetone -20°C. 72 hpf embryos were in addition treated with 20µl/mL proteinase K for 15 min. Embryos were then incubated in blocking solution (1% Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma D2650), 1% BSA (Sigma A7906), 2% sheep serum in PBS). Incubation with the primary antibodies was performed for 4h at room temperature or overnight at 4°C. After washing, embryos were incubated with fluorochrome coupled secondary antibodies for 3 h, and embryos were stored at 4°C in fluorescent mounting medium (DakoCytomation S3023) and mounted for observations in 70% glycerol. Whole-mount embryos were observed with a Zeiss LSM510 or a Leica SP5 spectral confocal microscope. Images were processed using Adobe Photoshop and Image J softwares.

Different primary and secondary antibodies were used: the generated rabbit polyclonal antibodies to zebrafish COLXXII; antibodies to zebrafish COLXII (Bader et al, 2009); anti-dystrophin, F59 and S58 and ZN-8 from the Hybridoma bank; anti-alpha actinin (A7811) and rabbit anti-laminin (L9393) from Sigma. When indicated, nuclei were stained with Hoechst

solution and actin with phalloïdin-rhodamin (all from Sigma). The secondary antibodies were the following: anti-guinea pig IgG Ab coupled to Cy2 and to Cy3; anti-rabbit and anti-mouse IgG coupled to Alexa488; anti-rabbit IgG coupled to Alexa543 (all from Jackson ImmunoResearch).

#### *Video microscopy*

Live 5 dpf fishes were placed into 100 mm diameter Petri dishes in Danieau supplemented with 0.3% methylcellulose. The motility or lack of motility of larvae after touch stimulation was recorded with a macroscope (Macro-Fluor, Leica) equipped with a digital camera.

#### *Transmission electron microscopy*

Whole embryos and larvae were sacrificed by incubation with excess of tricaine and fixed overnight in 1.5% glutaraldehyde and 1.5% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) at 4°C followed by washing in 0.1 M cacodylate buffer, 10% sucrose. Samples were then post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature, subsequently dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in epoxy resin. Thin sections were stained with Methylene blue/azur II (vol:vol) and observed with a light microscope (Leica) equipped with a digital camera (Nikon). Ultra thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and observed with a Phillips CM 120 electron microscope at the “Centre Technique des Microstructures, Lyon 1” equipped with a digital CCD camera (Gatan).

#### *Protein extraction and Western blot analysis*

Dechorionated wild type and MO22-injected embryos (30/stage/experiment, n=3) at 28 and 48 hpf were sacrificed and yolks were removed. Subsequently, embryos were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. Embryos were lysed in 25 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% DOC, 0.5% NP40, 40 mM sodium beta-glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate and Protease Inhibitor Cocktail 1/100 (Sigma), centrifuged for 30 min at 15000xg. Protein concentration was determined on supernatants. Supernatants and pellets were both treated with Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Supernatants (12 to 24 µg) were used for ERK1/2 and Akt pathways analysis

and pellets for COLXXII detection using our polyclonal antibodies. Immunological detection was performed with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies, using AttoPhos (Promega) as a substrate. The following primary antibodies were used: polyclonal anti-ERK1/2 antibody from Millipore (Billerica, MA), polyclonal anti-Akt, polyclonal anti-phospho-Ser473 Akt and monoclonal anti-phospho-Thr202/Tyr204 ERK1/2 antibodies from Cell Signaling Technology (Danvers, MA).

### *RT-PCR*

Zebrafish total RNA (n=20 embryos per condition) was isolated according to the TRIZOL method (Invitrogen). For reverse transcription, total RNA was annealed with random primers (Promega) at 70°C for 10 min followed by the addition of M-MLV (Promega) reaction mix and incubation at 37°C for 1h. cDNAs were stored at -20°C until used. PCR reaction contained cDNA, 10x PCR buffer (Biolabs), 5nmol desoxynucleotide triphosphate (Promega), 0.5U taq polymerase (Biolabs), 6.25 nmol primers. PCR reactions were analyzed with 1% agarose gel electrophoresis. The following primers were used *Col22a1* forward 5'-CGTTTGACCTCCTCCAATGT-3' *Col22a1* reverse 5'-GTGGGCAAGGAGAATTTTGA -3', *Fgf4* forward 5'-TTGCCAATCCTGGTCTTAGG-3', *Fgf4* reverse 5'-TTCAGAGAAAAGCTCCTCGC-3', *Fgf8* forward 5'-AATCCGGACCTACCAGCTTT-3' *Fgf8* reverse 5'-TGCGTTTAGACCGTCTGTTG-3', *Scx* forward 5'-TGATGTCGGAGGATGATGAA-3' and *Scx* reverse 5'-AGCCGTGGTGGTGGTAGTAG-3', *beta-actin* forward 5'-AAGCAGGAGTACGATGAGTCTG-3' and reverse 5'-GGTAAACGCTTCTGGAATGAC. PCR reactions were analyzed with 1% agarose gel electrophoresis.

### *Muscle contraction measurements*

Zebrafish larvae were anesthetized with 0.017% tricaine in E3 medium and the head was crushed. The E3 medium was then replaced by a bath solution containing (mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes (pH 7.2). The tail was stuck to the bottom of the dish using a small pin while the head was hung on the extended arm of an AE801 force transducer mounted on a micromanipulator that allowed length adjustment. Stimulation was performed using two platinum electrodes placed on either side of the fish. The force signal was acquired at a sampling



frequency of 1 kHz using the WinWCP software (Strathclyde University, UK) driving an A-D converter. The whole fish musculature was stimulated by applying electric field pulses of 0.5-ms duration. In each larva tested, the voltage was progressively augmented to give maximal twitch response and the stimulation intensity that was selected was around 20% above the intensity eliciting maximal contraction. The larvae were then gradually stretched from a resting length up to an optimal length giving maximal force signal in response to supramaximal stimulation. The twitch amplitude remained stable over several minutes using a 0.2-Hz stimulation frequency. The contraction amplitude was measured at the peak of the force signal.

### *Protein rescue*

Purified recombinant zebrafish COLXXII vWA domain and human full length COLXXII, or the human recombinant TSPN domain of COLV (Bonod-Bidaud et al., 2007) as negative control, were used to rescue the MO22-injected phenotype. Varying quantities (from 0.08 to 0.32 ng) of the different recombinant proteins were micro-injected into one- or two- cells stage embryos either alone or in combination with 8.5 ng MO22b morpholino or *coll1a1* morpholino (Baas et al., 2009) as negative control.

## Online Supplemental Material

**Table S1:** Morpholino-knockdown and rescue statistics (left) and light microscopy images of mild, moderate and severe MO22-injected embryo phenotype (right).

**Figure S1:** **A-** RT-PCR analysis of zebrafish *col22a1* at different developmental stages. **B** - 1. 10% SDS-PAGE analysis of the purified recombinant vWA domain produced in 293-HEK cells - The band migrates at the expected position. 2. Western-blot analysis of 293-HEK conditioned media using the polyclonal antibodies obtained after rabbit immunization with the recombinant vWA domain. **C.** 6% SDS-PAGE analysis of the purified recombinant full-length human collagen XXII produced in 293-HEK cells (Lane 1, load; lane 2, flow; lane 3, wash; and lane 4-6 eluates). According the gel, collagen XXII is highly purified and devoid of fragmentation products. Immunofluorescence analysis of collagen XXII expression in adult zebrafish. Frozen

cross sections (D) and lateral sections (E) are stained with rabbit polyclonal antibodies raised against zebrafish recombinant vWA domain of COLXXII. Arrows, myosepta. Bars = 20  $\mu$ m

**Figure S2:** Motor neuron labeling with Zn-8 neuronal marker - Motor neuron axon projections of 26 hpf (A, B) and 72 hpf (C, D) wild-type (A, C) and MO22-injected (B, D) embryos. Confocal images of whole-mount embryos stained with Zn-8 show the onset of axon migration at 26 hpf (A, arrows) and the pattern of axonal scaffolds (B, arrows) of 72 hpf (B) wild type embryos. No difference is observed between 26 hpf wild-type (A, arrowheads) and MO22-injected embryos (C, arrowheads). At 72 hpf, axon projections in MO22-injected embryos are shorter or retracted (D, arrowheads) compared to wild type (C, arrowheads). Lateral views with anterior to the left.

### Video 1

Online video recording of swimming capacity of 5 dpf wild type (WT, left) and MO22-injected (MO22, right) larvae.

### Video 2

Online video recording of swimming rescue of 5 dpf MO22-injected embryos coinjected with zebrafish vWA domain (left, MO22+zf vWA 0.32 ng) or human full length COLXXII (right, MO22+hCOL22 0.16 ng).

**Acknowledgments:** We thank Dr Claire Allen (Centre for Developmental and Biomedical Genetics, University of Sheffield, UK) for supplying the zebrafish *ace* mutants and providing *sapje* embryos. We thank L. Bernard (PRECI, IFR 128 Biosciences Gerland, Lyon) for fish maintenance and helpful advices. Confocal microscopy observations were all performed at the PLATIM core facility (IFR 128 Biosciences Gerland, Lyon) with the expert technical assistance of C. Chamot. TEM was performed at the Centre Technique des microstructures (University of Lyon). This work was supported by grants from the ANR, Emergence Research Program (Région Rhône-Alpes), and from the University Lyon 1 (BQR), CNRS and AFM. BC is a recipient of FRM (France).

## References

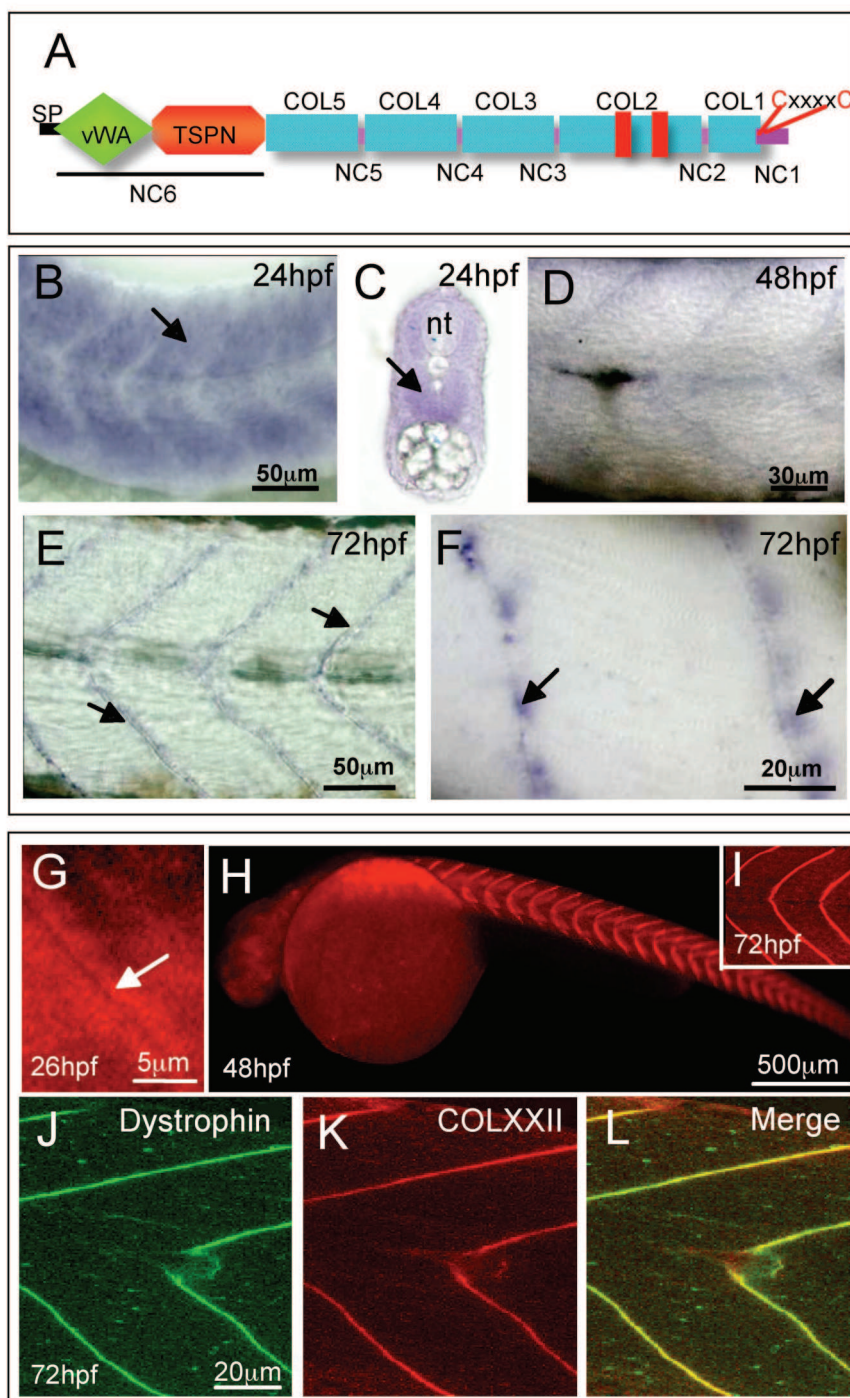
- Baas, D., M. Malbouyres, Z. Haftek-Terreau, D. Le Guellec, and F. Ruggiero. 2009. Craniofacial cartilage morphogenesis requires zebrafish *coll1a1* activity. *Matrix Biol.* 28:490-502.
- Bader, H.L., D.R. Keene, B. Charvet, G. Veit, W. Driever, M. Koch, and F. Ruggiero. 2009. Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissue sheaths (fascia) and basement membranes. *Matrix Biol.* 28:32-43.
- Bassett, D.I., R.J. Bryson-Richardson, D.F. Daggett, P. Gautier, D.G. Keenan, and P.D. Currie. 2003. Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development.* 130:5851-60.
- Bassett, D.I., P.D. Currie 2003. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 12 :265-270.
- Bell, S.E., A. Mavila, R. Salazar, K.J. Bayless, S. Kanagala, S.A. Maxwell, and G.E. Davis. 2001. Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *J Cell Sci.* 114:2755-73.
- Bonod-Bidaud C, M. Beraud , E. Vaganay, F. Delacoux, B. Font, D.J. Hulmes and F. Ruggiero. 2007. Enzymatic cleavage specificity of the pro $\alpha$ 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem J.* 405:299-306.
- Cohn, R.D., and K.P. Campbell. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 23:1456-71.
- Desaki, J. 1992. Scanning electron microscopical study of skeletal muscle fiber ends in normal and dystrophic mice. *Arch Histol Cytol.* 55:449-52.
- Edom-Vovard, F., M. Bonnin, and D. Duprez. 2001. Fgf8 transcripts are located in tendons during embryonic chick limb development. *Mech Dev.* 108:203-6.
- Edom-Vovard, F., and D. Duprez. 2004. Signals regulating tendon formation during chick embryonic development. *Dev Dyn.* 229:449-57.
- Edom-Vovard, F., B. Schuler, M.A. Bonnin, M.A. Teillet, and D. Duprez. 2002. Fgf4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev Biol.* 247:351-66.
- Granato, M., F.J. van Eeden, U. Schach, T. Trowe, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, D.A. Kane, R.N. Kelsh, M.C. Mullins, J.

- Odenthal, and C. Nusslein-Volhard. 1996. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development*. 123:399-413.
- Guyon, J.R., A.N. Mosley, S.J. Jun, F. Montanaro, L.S. Steffen, Y. Zhou, V. Nigro, L.I. Zon, and L.M. Kunkel. 2005. Delta-sarcoglycan is required for early zebrafish muscle organization. *Exp Cell Res*. 304:105-15.
- Hall, T.E., R.J. Bryson-Richardson, S. Berger, A.S. Jacoby, N.J. Cole, G.E. Hollway, J. Berger, and P.D. Currie. 2007. The zebrafish candyfloss mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin alpha2-deficient congenital muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:7092-7.
- Hayashi, Y.K., F.L. Chou, E. Engvall, M. Ogawa, C. Matsuda, S. Hirabayashi, K. Yokochi, B.L. Ziober, R.H. Kramer, S.J. Kaufman, E. Ozawa, Y. Goto, I. Nonaka, T. Tsukahara, J.Z. Wang, E.P. Hoffman, and K. Arahata. 1998. Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat Genet*. 19:94-7.
- Helbling-Leclerc, A., X. Zhang, H. Topaloglu, C. Cruaud, F. Tesson, J. Weissenbach, F.M. Tome, K. Schwartz, M. Fardeau, K. Tryggvason, and Guicheney P. 1995. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet*. 11:216-8.
- Henry, C.A., I.M. McNulty, W.A. Durst, S.E. Munchel, and S.L. Amacher. 2005. Interactions between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev Biol*. 287:346-60.
- Ingham, P.W. 2009. The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet*. 18:R107-12.
- Jacoby, A.S., E. Busch-Nentwich, R.J. Bryson-Richardson, T.E. Hall, J. Berger, S. Berger, C. Sonntag, C. Sachs, R. Geisler, D.L. Stemple, and P.D. Currie. 2009. The zebrafish dystrophic mutant softy maintains muscle fibre viability despite basement membrane rupture and muscle detachment. *Development*. 136:3367-76.
- Ker, E.D., B. Chu, J.A. Phillippi, B. Gharaibeh, J. Huard, L.E. Weiss, and P.G. Campbell. 2011. Engineering spatial control of multiple differentiation fates within a stem cell population. *Biomaterials*. 32:3413-22.
- Koch, M., J. Schulze, U. Hansen, T. Ashwodt, D.R. Keene, W.J. Brunken, R.E. Burgeson, P. Bruckner, and L. Bruckner-Tuderman. 2004. A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J Biol Chem*. 279:22514-21.
- Lewis, K.E., and J.S. Eisen. 2004. Paraxial mesoderm specifies zebrafish primary motoneuron subtype identity. *Development*. 131:891-902.

- Lisi, M.T., and R.D. Cohn. 2007. Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta*. 1772:159-72.
- Miosge, N., C. Klenczar, R. Herken, M. Willem, and U. Mayer. 1999. Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest*. 79:1591-9.
- Mohamed, J.S., and A.M. Boriek. 2010. Stretch augments TGF-beta1 expression through RhoA/ROCK1/2, PTK, and PI3K in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 299:L413-24.
- Parsons, M.J., I. Campos, E.M. Hirst, and D.L. Stemple. 2002. Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development*. 129:3505-12.
- Postel, R., P. Vakeel, J. Topczewski, R. Knoll, and J. Bakkers. 2008. Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev Biol*. 318:92-101.
- Reifers, F., H. Bohli, E.C. Walsh, P.H. Crossley, D.Y. Stainier, and M. Brand. 1998. Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development*. 125:2381-95.
- Ricard-Blum, S., and F. Ruggiero. 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)*. 53:430-42.
- Whittaker, C.A., and R.O. Hynes. 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*. 13:3369-87.
- Wu, M., M. Falasca, and E.R. Blough. 2010. Akt/protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *J Cell Physiol*. 226:29-36.

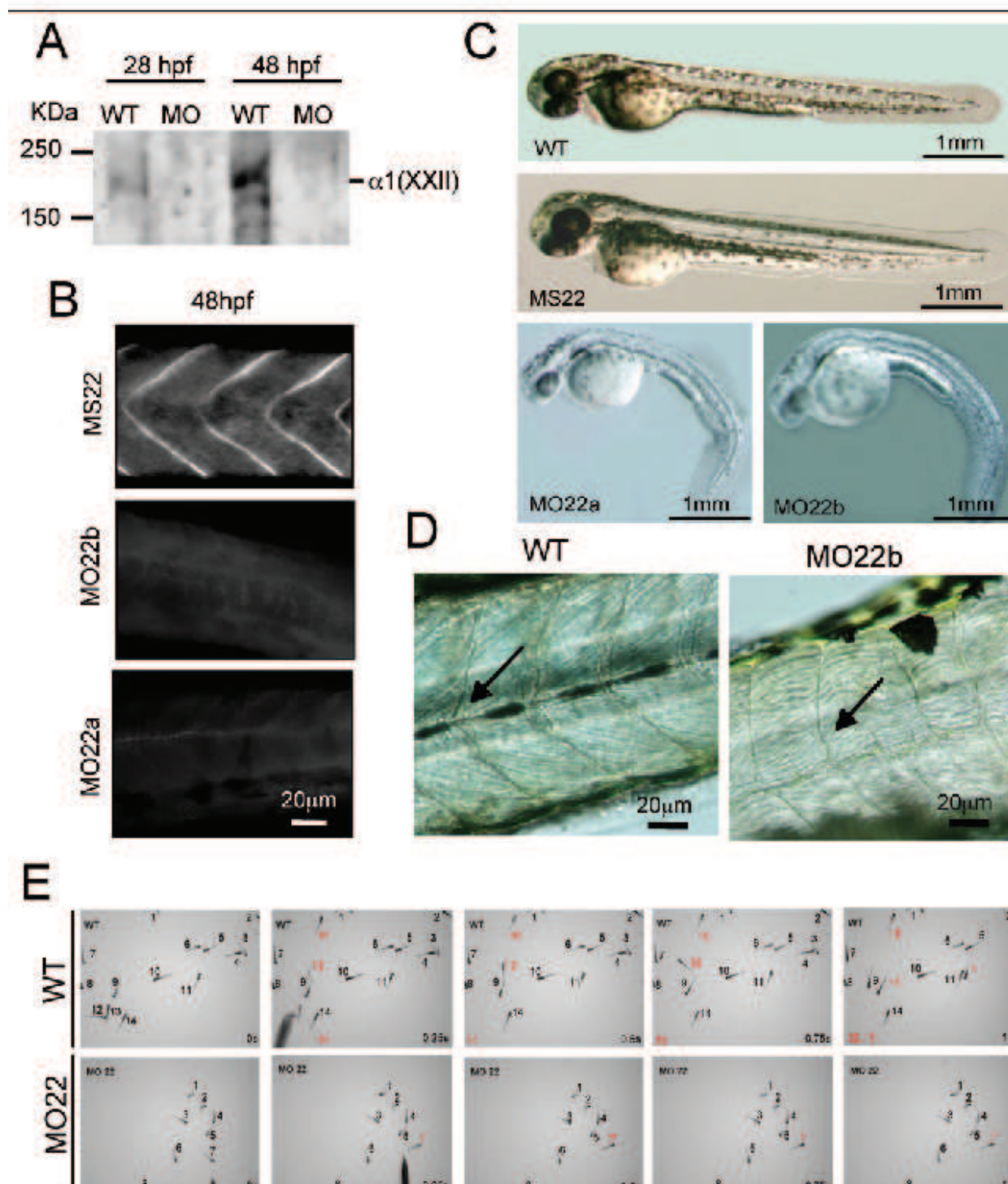
Figures

Charvet\_Figure 1

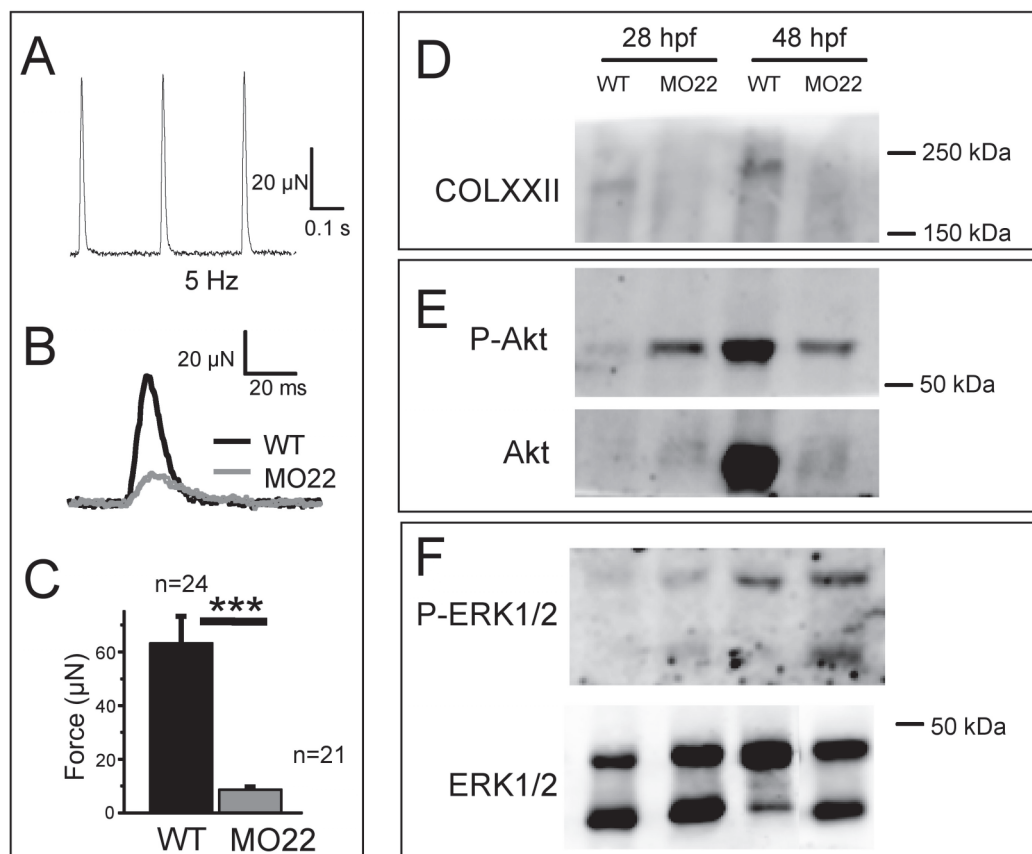




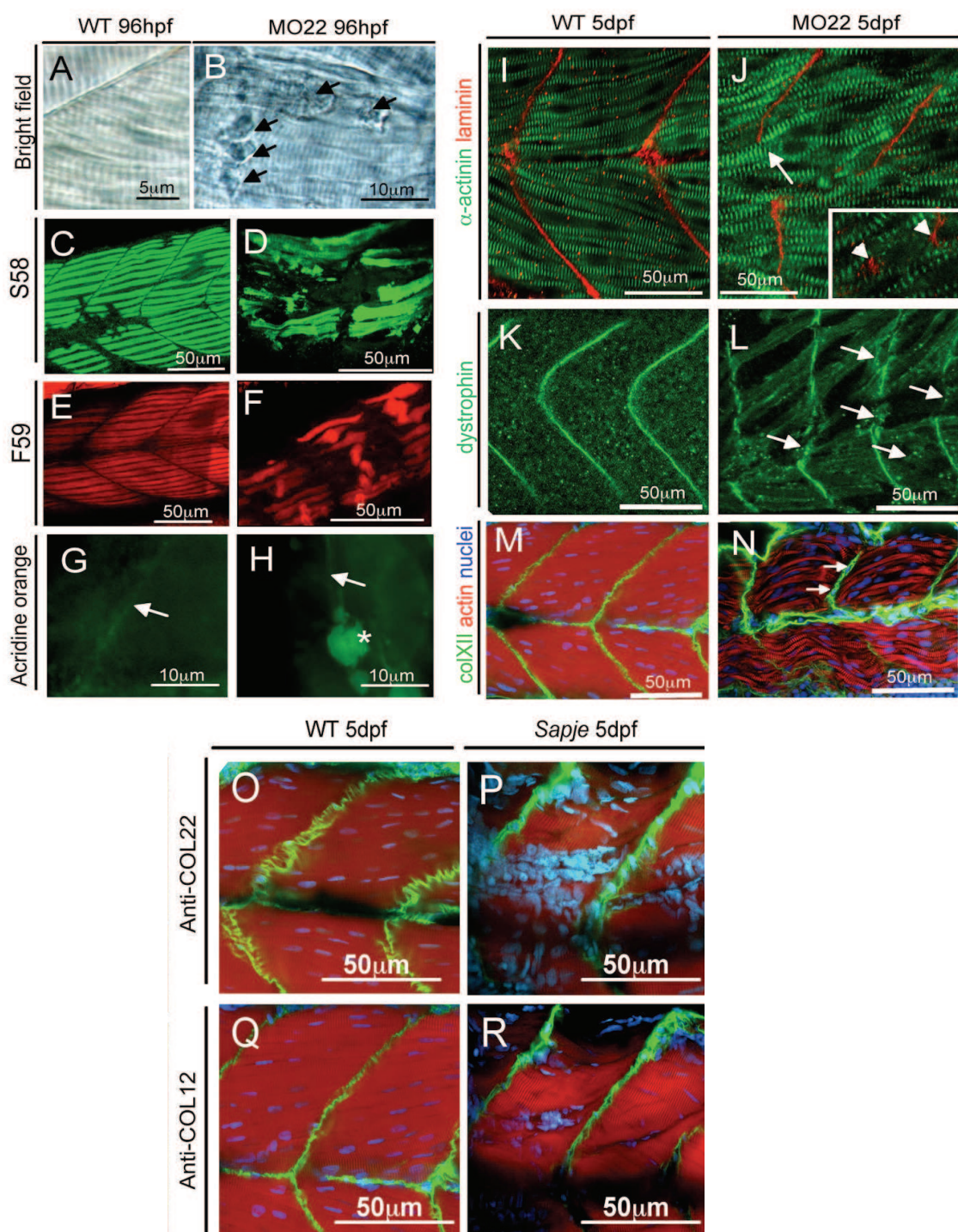
# Charvet\_Figure2



# Charvet\_Figure 3

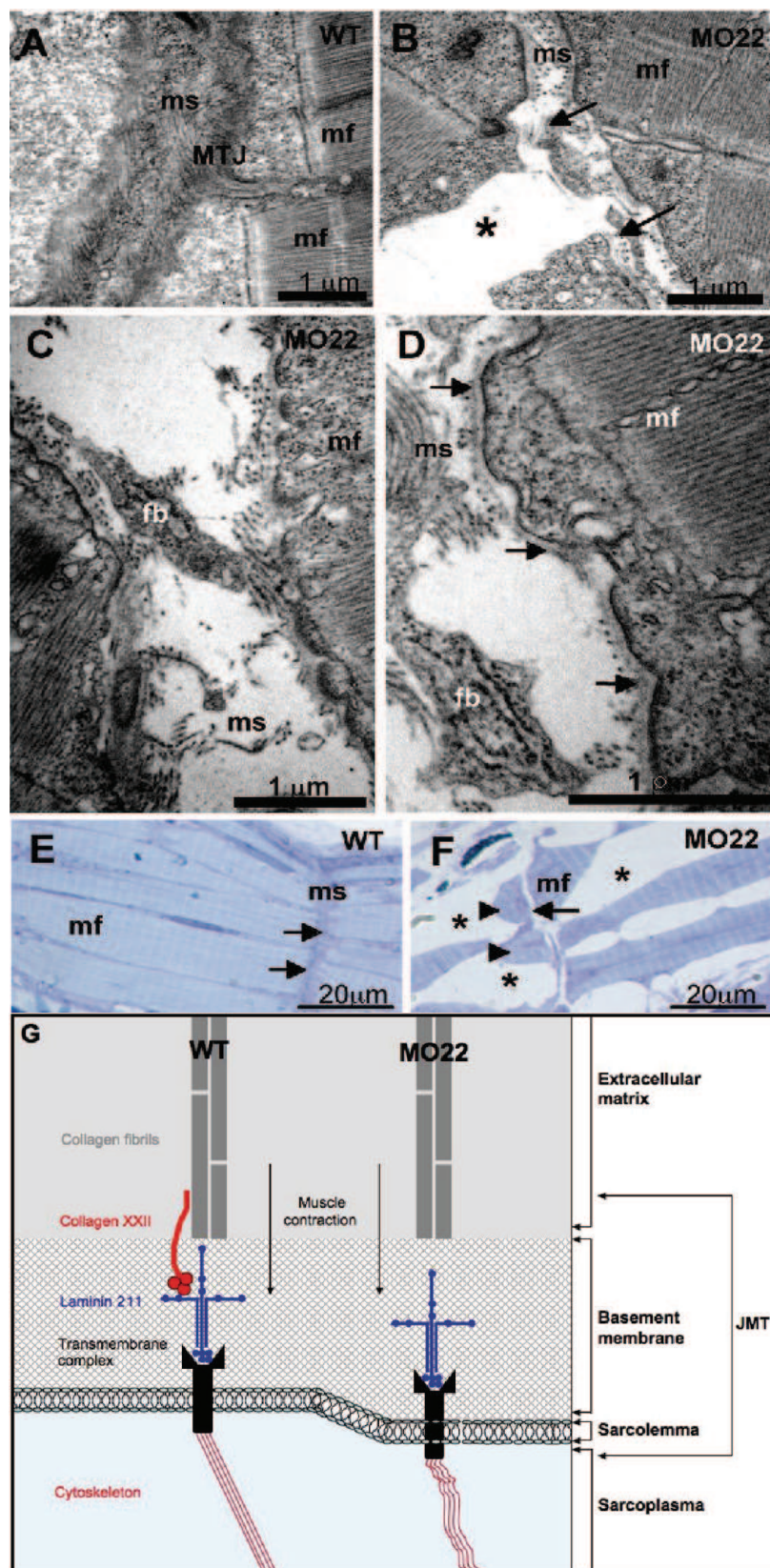


Charvet\_Figure 4

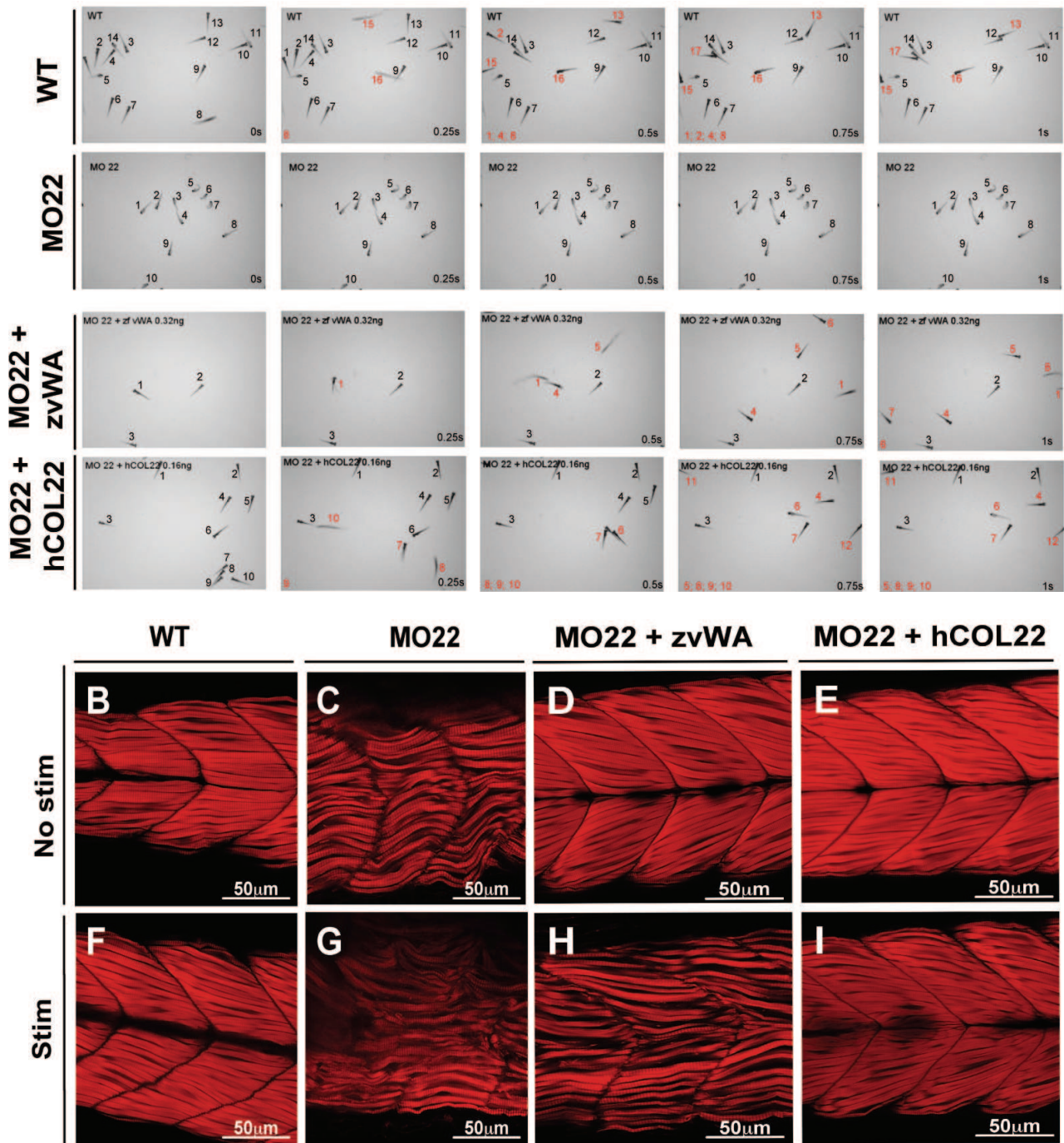




Charvet\_Figure5

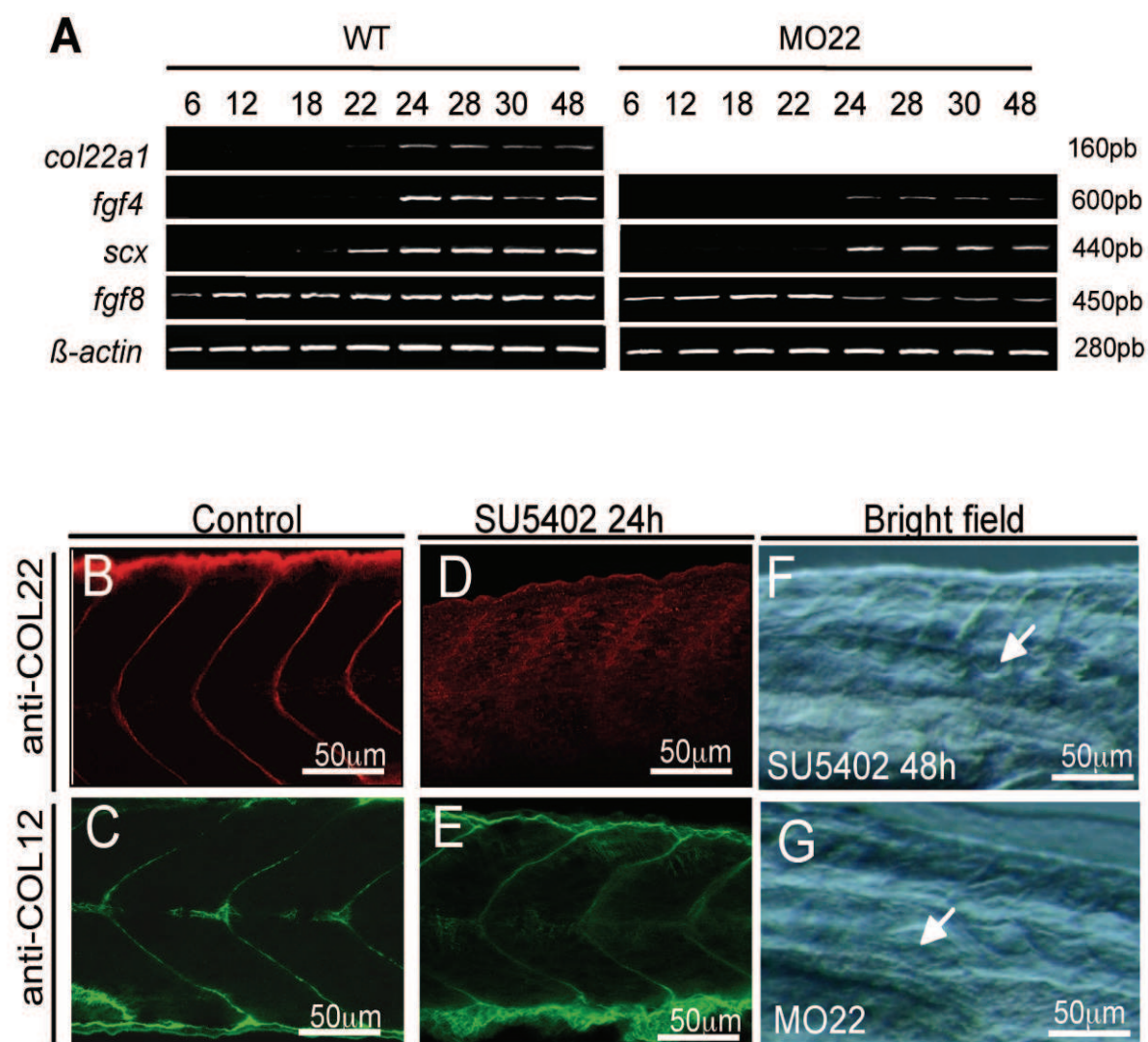


Charvet\_Figure 6



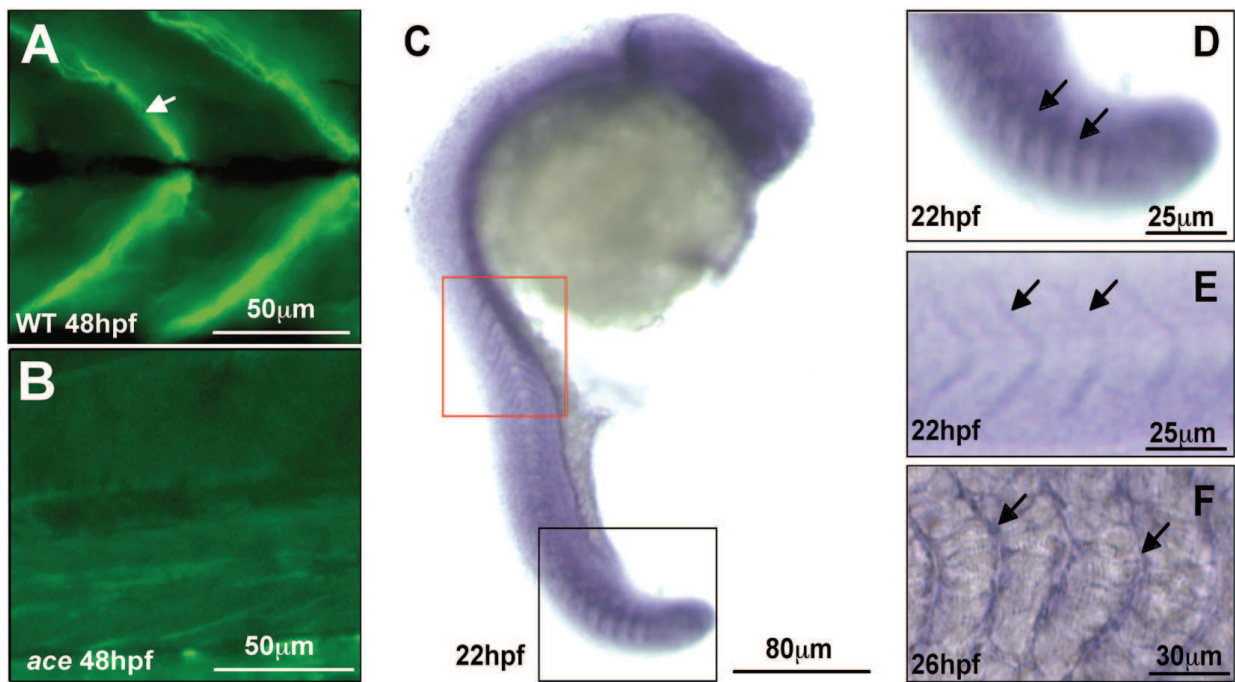


Charvet\_Figure 7





Charvet\_Figure 8



## Figure legends

**Figure 1: Expression pattern of zebrafish *col22a1* transcript and of COLXXII protein** - **A** –Schematic structure of the alpha1 chain of zebrafish collagen XXII. SP signal peptide, COL collagenous domains, NC non collagenous domain, vWA domain, TSPN domain. Red stripes, conserved interruptions of the collagenous domain COL2, CxxxxC, conserved motif in FACIT. **B to F** - Whole mount in situ hybridizations with vWA domain antisense probe showing spatiotemporal expression pattern of *col22a1* transcripts in developing zebrafish. At 24 hpf (**B**, and transverse section **C**) transcripts are detected throughout the myotomes. At 48 hpf (**D**) and 72 hpf (**E**, **F**) signal progressively accumulates at the extremities of muscle fibers (arrows). Note in **F** that no signal is detected in myosepta. Whole mount immunofluorescence with rabbit polyclonal antibodies raised against zebrafish recombinant vWA domain of COLXXII. **G** - At 26 hpf, COLXXII is detected throughout the myotomes but the protein starts to accumulate along the myosepta (arrow). **H-I** – At 48 hpf (**H**) and 72 hpf (**I**), COLXXII is specifically detected at somite boundaries in whole embryos. **J-L** - Merge (**L**) of fluorescence images of 72 hpf embryo stained with anti-dystrophin (**J**, green) and anti-COLXXII (**K**, red) antibodies indicate that COLXXII specifically localizes at the myotendinous junction. No, notochord; nt, neural tube. **B**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**, **K**, **L** lateral views with anterior to the left ; **C** transverse sections.

**Figure 2: Morpholino knockdown of *col22a1* in developing zebrafish.** Verification of the morpholino-based knockdown of COLXXII by Western-blot (**A**) and immunofluorescence staining with antibodies to COLXXII (**B**). **A** - A band corresponding to the alpha1 chain of COLXXII is detected in 28 hpf wild type (WT) embryo extracts that strongly increases at 48 hpf, the protein is not detected in MO22b-injected embryos (MO22). **B** - The lack of protein expression was also validated by whole mount immunofluorescence staining. Note that at 48 hpf, the protein is expressed in the 5 base-mismatch morpholino control (MS22) whereas no signal is detected in 48 hpf MO22a and MO22b-injected embryos. Bar = 20  $\mu$ m. **C**, **D** – 90% of MO22-injected embryos (MO22B) display a tail curvature (**C**) and U-shaped somites (**D**). Control MS-injected embryos (MS22) are similar to wild type (WT). **C**, 48hpf embryos; **D**, 96 hpf larvae. Anterior to the left. **E** – Stills from time-lapse movie showing swimming ability of 5 dpf wild

type (WT) and *Col22a1* morphants (MO) larvae after touch stimulation. Numbers in red point to static larvae and numbers in black to moving embryos.

**Figure 3: A-C – Measurement of muscle force.** A. Recording of contraction in response to single supramaximal electric shocks applied to a 5-day old wild-type fish. B, Twitch responses compared in 5 dpf wild type (black) and MO22-injected (grey) larvae. C, mean contraction amplitudes in 5 dpf wild type (black) and MO22-injected (grey) larvae. Phosphoblot analysis of 28 hpf and 48 hpf extracts from wild-type (WT) and MO22-injected embryos (MO22) with Phospho-Akt (B) or Phospho-ERK1/2 (C). Extinction of COLXXII in 28 hpf and 48 hpf MO22-injected embryos is shown in D. The lower panels in E and F represent Western-blot for total Akt (E) and ERK (F) proteins respectively. E strong induction of Akt expression is observed in 48hpf wild type but not in MO22-injected embryos (E). No change in ERK expression or phosphorylation is observed in MO22-injected embryos compared to wild type (F).

**Figure 4: Characterization of the MO22-injected embryo phenotype.** *Col22a1* knockdown resulted in skeletal muscle lesions. In 96 hpf MO22-injected larvae, numerous muscle fibers detach from myosepta and retract (B, arrows) whereas muscle fibers in wild type are intact (A). Lesions were observed in slow (D) and fast muscle fibers (F) of 72 hpf MO22-injected larvae stained respectively with S58 and F59 antibodies, whereas slow (C) and fast (E) muscle fibers of 72 hpf wild type larvae are intact and span the entire somite between myosepta. Acridine orange stains retracted apoptic muscle fibers in 96 hpf MO22-injected embryos (H, asterisk) but not in wild type (G). Arrows point to myoseptum. **I-N** - Whole mount confocal immunofluorescence of 5dpf wild type (WT) and MO22-injected larvae (MO22). **I, J** - double immunostaining with  $\alpha$ -actinin (green) and laminin (red) antibodies. Laminin staining delineates the myosepta in wild type larvae (I) whereas the signal is often interrupted in MO22-injected larvae (J). Laminin epitopes are retained at the membrane of detached muscle fibers (J insert, arrowhead). Large lesion of myosepta is also observed allowing the formation of giant muscle fibers (J, arrow). **K, L** - Dystrophin antibodies stain the muscle fiber ends in WT larvae (K). In MO22-injected larvae, numerous muscle cells have detached from myosepta and retracted (L, arrows) resulting

in gaps within the myotome. Retracted cells are dystrophin-positive indicating that sarcolemma integrity is not affected. **M, N** – Immunofluorescence staining of WT (M) and MO22-injected larvae (N) with collagen XII (COLXII) antibodies (green), phalloïdin (red) with nuclei stained in blue with Hoechst stain. The localization of myosepta marker COLXII is unaltered in morphants (N) compared to wild type (M). Note that nucleus staining (arrows) is detected in the myosepta of MO22-injected larvae (N), but not of WT (M). **O-R** -Expression of collagen XII and XXII in sapje embryos - Whole-mount fluorescence staining of 5 dpf wild type (O, Q) and sap mutants (P, R) larvae with antibodies against collagen XXII (COL22, green; O, P) or collagen XII (COL12, green, Q, R). Actin is stained phalloidin-rhodamin (red) and nuclei (blue) with Hoechst solution. Arrows (P, R) point to fibroblasts that have invaded myotomal lesions. Lateral views with anterior to the left.

**Figure 5: Ultrastructure analysis of MTJ disruption** - **A-D**, Transmission electron micrographs of the myotendinous junction in 5 dpf wild type (A) and MO22-injected larvae (B-D). A – Wild-type muscle fibers attach obliquely to the vertical myosepta composed of tightly packed collagen fibers arranged into oblic arrays. B, C – In MO22-injected larvae, muscle fiber differentiation and sarcomeric banding is unaffected in intact muscle fibers. Muscle fiber detachment resulted in the presence of cell-free space in myotome (asterisk), the basement membrane being torn with cell detachment (B). Collagen fibers of the myosepta are loosely packed (B, C) and tears are observed between myosepta and muscle fibers. Contrary to wild-type (A), numerous fibroblasts are observed in the myosepta (B, arrows and C). Tears occur preferentially between myoseptal collagen fibers and muscle cell basement membrane (D, arrows). **E, F** – In MO-22 injected larvae (F) histology reveals numerous cell-free spaces (asterisks), retracted muscles cells (arrowhead) and the clear appearance of myosepta (arrows) that does not stain with Methyl-Azur blue contrary to wild-type (E, arrows). Ms, myosepta; mf, muscle fiber; fb, fibroblast; MTJ, myotendinous junction. . **G** - Proposed model of the MTJ illustrating the location and function of COLXXII in wild type animals (WT, left) and rupture of the MTJ between basement membrane and tendon collagen fibrils in absence of COLXXII (MO22, right).

**Figure 6: Injection of COLXXII protein rescues the muscle fiber detachment phenotype.** **A** Stills from time-lapse movie showing swimming ability of 5 dpf wild type (WT), *Col22a1* morphants (MO), MO22 co-injected with zebrafish vWA domain (zvWA) or with human COLXXII (hCOL22) larvae. Numbers in red point to static larvae and numbers in black to moving embryos. **B-I** - Whole-mount fluorescence staining with phalloïdin-rhodamin of 72 hpf wild type (B, F), MO22-injected (C, G), and MO22 co-injected with zebrafish vWA domain (zvWA) (D, H) or the human entire COLXXII (hCOL22) (E, I) embryos stimulated (stim, F-I) or not (no stim, B-E) with repeated electric shocks. Note that when embryos are challenged by applying repeated electric shocks, the MO22 phenotype is only rescued with human COLXXII.

**Figure 7: FGF signal is responsible for inducing COLXXII expression.** **A.** Analysis of *col22a1*, *Fgf4*, *scx*, *Fgf8* and  $\beta$ -actin (as control) gene expression by RT-PCR performed on RNA extracted from wild type embryos (left panel) and MO-22 injected embryos (right panel) at different stages. **B-I.** Whole mount immunofluorescence staining with anti-collagen XXII (B, D) or anti-collagen XII (C, E) of 48 hpf embryos treated (D, E) or not (B, C) with SU5402. Transmitted light images of 72 hpf embryos treated with SU5402 (F) or MO22-injected embryos (G). SU5402-treated embryos phenocopy the MO22-injected embryos (arrows indicate muscle defects).

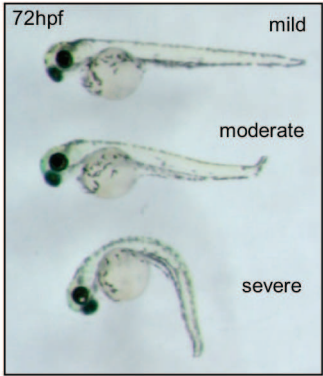
**Figure 8: *Col22a1* expression is regulated by FGF8 signal emanating from myoseptal tendon.** **A, B** - Whole mount immunofluorescence staining with anti-collagen XXII (green) of 48 hpf wild type (A) or *ace* (B) embryos. **C-F** – Whole mount in-situ hybridization of 22hpf embryo (C-E) and 26 hpf (F) with *fgf8* antisense probe. C, *fgf8* is expressed in presomitic mesoderm (arrows) (D, zoom view of black box in C) and in myoseptal tendon (E, zoom view of red box in C). Expression in myosepta is maintained at 26hpf (arrows, F).

Charvet et al\_Table S1

Morpholino and Rescue statistics

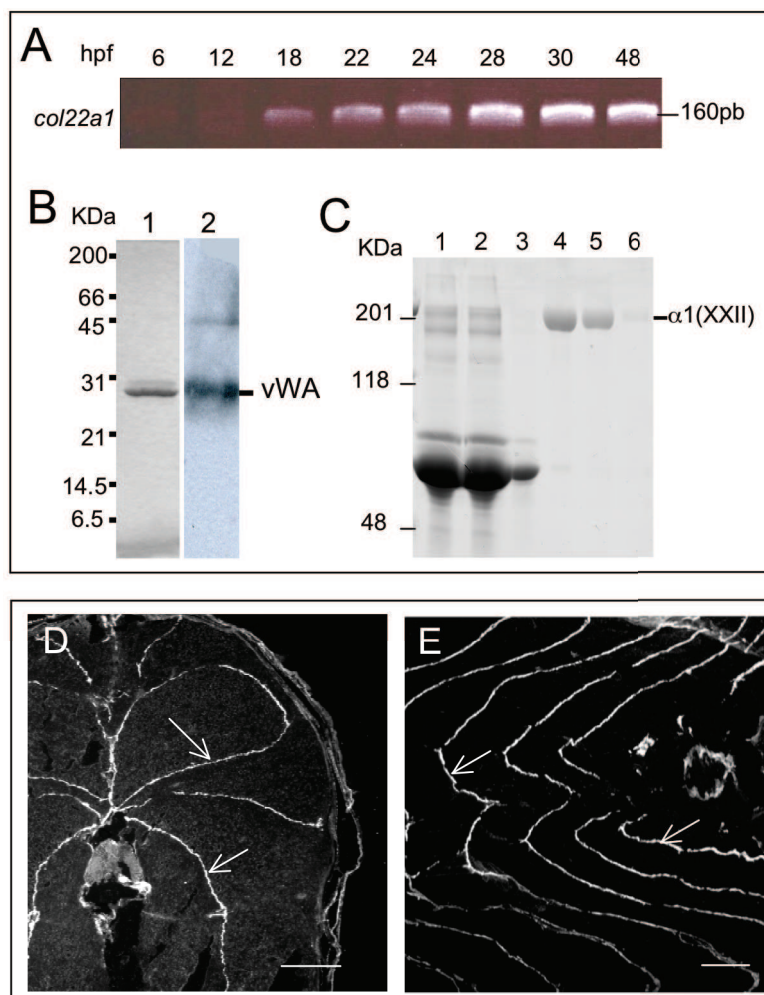
injection (8.5 ng)	total embryo number	No phenotype	72hpf				
			myosepta /muscle malformation			other malformations	mortality
			mild	moderate	severe		
WT (no injected embryo)	1000	98%	0%	0%	0%	1%	1%
Ms	1000	92%	1%	0%	0%	3%	4%
MO22a	1000	2%	19%	46%	24%	2%	7%
MO22b	1000	1%	26%	39%	27%	1%	6%
MO22b+ ZFvWA22(0.32ng)	1000	81%	5%	4%	1%	3%	6%
MO22b+ hCOLXXII(0.16ng)	1000	88%	04%	2%	0%	2%	4%

inj.: injection; Ms: 5-base mismatch morpholino, MO: morpholino, vWAzI22: zebrafish collagen XXII von Willebrand recombinant domain; hCOLXXII: human full length recombinant collagen XXII.

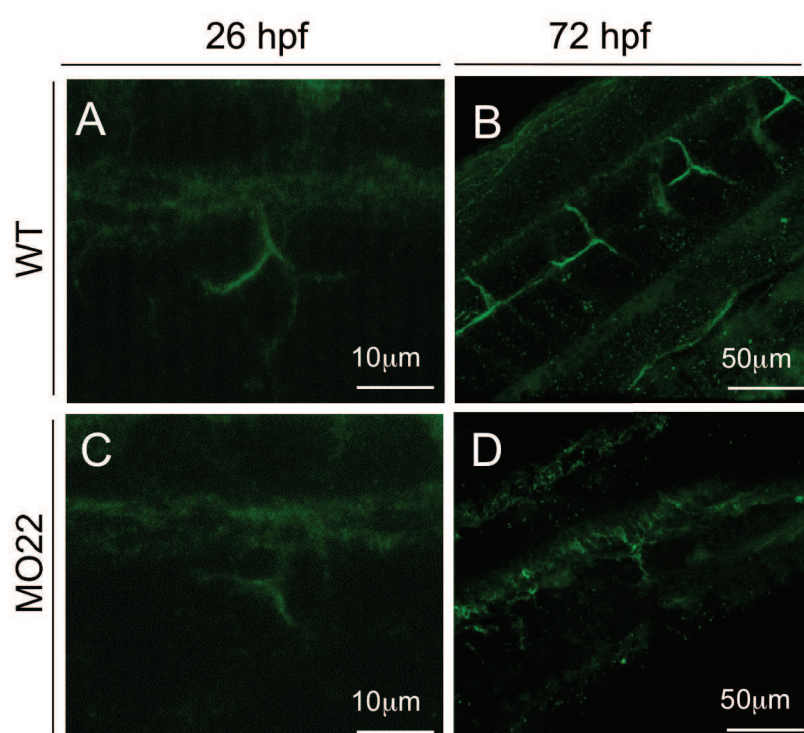




Charvet et al - Figure S1 (related to Figure 1)



Charvet et al - Figure S2 (related to Figure 3)



## Résultats préliminaires et discussion :

### I. Le collagène XXII un nouveau composant de la JMT :

Le collagène XXII est localisé au niveau de la JMT à la fois chez la souris et chez le poisson zèbre. Les immunomarquages en MET du collagène XXII montrent la localisation de cette protéine aux abords de la lame basale, à l'interface avec la matrice fibrillaire (Koch *et al.*, 2004).

Les FACITs sont capables pour la plupart de se lier, directement ou non, aux collagènes fibrillaires par l'intermédiaire de leurs domaines COL (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005). Le collagène XXII possède un domaine vWA N-terminal capable de médier des interactions protéiques via son motif MIDAS (Metal Ion Dependant Adhesion Site). Les résultats de l'étude fonctionnelle du collagène XXII ont révélé que ce collagène forme un pont moléculaire entre la lame basale musculaire et la matrice fibrillaire du tendon. Cette hypothèse est appuyée par les observations des JMT des embryons MO22 en MET. En effet, on observe très clairement la présence de la lame basale (qui semble intacte) le long du sarcolemme des fibres musculaires détachées (Charvet *et al.*, soumis). De plus, les MO22 ont un phénotype comparable aux phénotypes des mutants *sapje* et *candyfloss* laissent penser que le collagène XXII serait impliqué dans les sites d'ancrage au niveau de la laminine 211.

#### 1. Le collagène XXII, et les laminines :

L'interaction entre le domaine vWA de la protéine humaine CMG2 (Capillary Morphogenesis protein 2) et les composants des lames basales comme les laminines et le collagène IV, durant la formation des vaisseaux sanguins, est avérée (Bell *et al.*, 2001). Quatre mutations sur les acides aminés du domaine vWA de la protéine CMG2 (vWA CMG2) provoquent l'apparition de fibromatose hyaline juvénile chez l'humain. Les fibroblastes issus de ces patients présentent un défaut d'adhérence sur les laminines (Lacy *et al.*, 2004). La comparaison des séquences protéiques des domaines vWA humain de CMG2 et du collagène XXII (vWA22) montre qu'en plus de la conservation du domaine MIDAS, trois des quatre acides aminés mutés impliqués dans le défaut d'adhérence sur les laminines, sont conservés dans le domaine vWA22 (figure 29). Ces observations laissent penser que le

collagène XXII pourrait interagir avec les laminines par l'intermédiaire de son domaine vWA. Pour vérifier cette hypothèse, un domaine recombinant vWA22 de poisson zèbre a été produit et purifié dans le laboratoire de M. Koch. Ce domaine a été utilisé dans les expériences d'interaction réalisées en SPR (résonnance plasmonique de surface, Biacore) comme qu'analyte. Un mélange de laminines, de collagène VI et du collagène I ont été

```

vWA colXXII   MAGLRGNAVAG-----LLWMLLLWSGGGGCQAQRAGCKSVHYDVFLLTSSSVGKEDF  54
vWA CMG2      MVAERSPARSPGSLFPGWLWLLVLSGPGGLLRAQEQPSCRRAFDIYFVLKSGSVAN-NW  59
               *.. * . * :          **:*:* . ** :** . :      :** *:*:*.*.*.: ::

vWA colXXII   EKVQRQWVANLVDTFEVGPDRTRVGVRYSRPTAFELGLFGSQEEVKAAARRLAYHGGN 114
vWA CMG2      IEIYNFVQQLAERFVS--PEMRLSFIVFSSQAIIILPLTGDRGKISKGLEDLKRVSPVGE 117
               :: :*: :*. : *      . *.: : :*: :* : *      . : .      : . *:

vWA colXXII   TNTGDALRYITARSFSPHAGGRPRDRAYKQVAILTGRSODLVLDAAAAHRAIRIFA 174
vWA CMG2      TYIHEGLKLANEQ--IQKAGGLKTSSIIIALTDGKLGLVPSYAEKEAKISRSLGASVYC 175
               *  :*: . :      :*** .      : :      ** . . . * : : * :..

vWA colXXII   VGVGEALKEELEEIESEPKSAHVHVVS-DFNAIDKIRGKLRRRLCEN  220
vWA CMG2      VGVLDFEQAQLERIADSKE--QVFPVKGGFQALKGIINSILAQSCTE  220
               *** : : :*:***. : : ** * . *:*: . * . : : * :

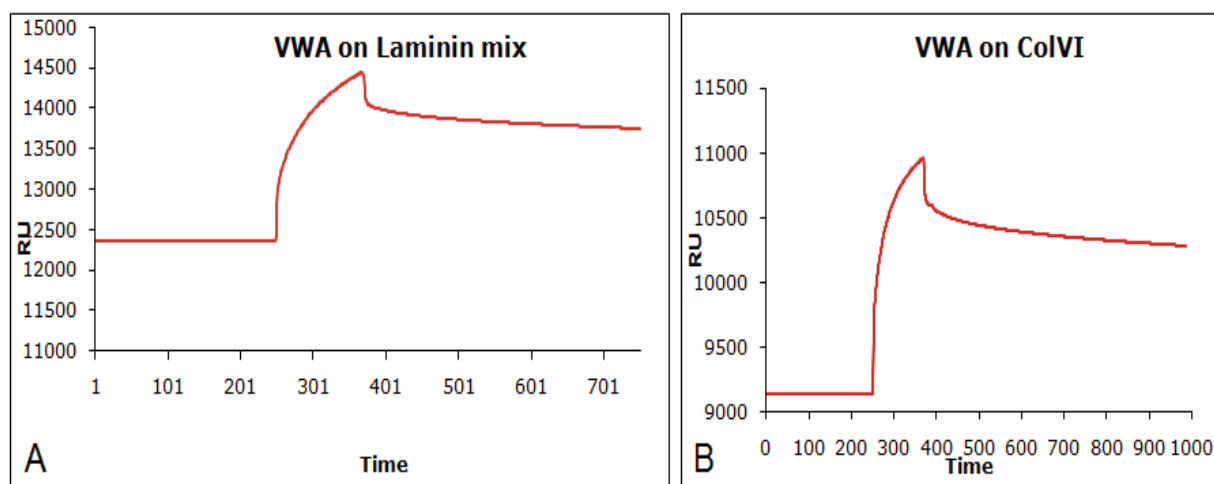
```

**Figure 29 : Comparaison des séquences des domaines vWA des protéines humaines CMG2 et collagène XXII :** Les acides aminés qui caractérisent le motif MIDAS (surligner en rouge) sont conservés (astérisque). Trois des quatre acides aminés du domaine vWA CMG2 mutés chez les fibroblastes de patients présentant un défaut de liaison aux laminines (surligner en noir) sont conservés (astérisque) dans le domaine vWA colXXII. L'alignement de séquence a été réalisé avec le logiciel CLUSTAL W.

immobilisées sur une sensor-chip, et le domaine recombinant a été injecté. Un signal, traduisant une interaction, avec le mélange de laminines et le collagène de type VI (figure 30, résultats non publiés) mais pas avec le collagène I (résultat non montré) ce qui représente un très bon témoin négatif. Ces résultats prometteurs devraient être confirmés en ajustant la concentration de  $Mg^{2+}$ , ions impliqués dans les liaisons protéiques utilisant le domaine MIDAS (Lacy *et al.*, 2004).

Seule laminine impliquée dans les systèmes d'ancrage du muscle sur le tendon au niveau de la JMT mature est la laminine 211. Les données nous suggèrent que le vWA du collagène XXII pourrait se lier aux laminines mais ne nous permettent pas de cibler la laminine 211. Notons toutefois que le mélange de laminines, utilisé pour les tests de Biacore, contient de la laminine 211. De manière intéressante, le poisson *candyfloss* (invalidé pour la chaîne  $\alpha 2$  des laminines), présente un phénotype comparable au MO22 avec un détachement

des cellules musculaires du myosepte vertical. La localisation et la fonction de ces deux protéines étant similaires, une interaction entre le collagène XXII et la laminine 211 serait tout à fait possible. Un modèle où le collagène XXII serait localisé entre la laminine 211 et les fibres de collagènes (figure 31).



**Figure 30 : Détection d'interactions entre le vWA22 de poisson zèbre et les laminines de souris (A) ou entre le vWA22 et le collagène VI humain (B).**

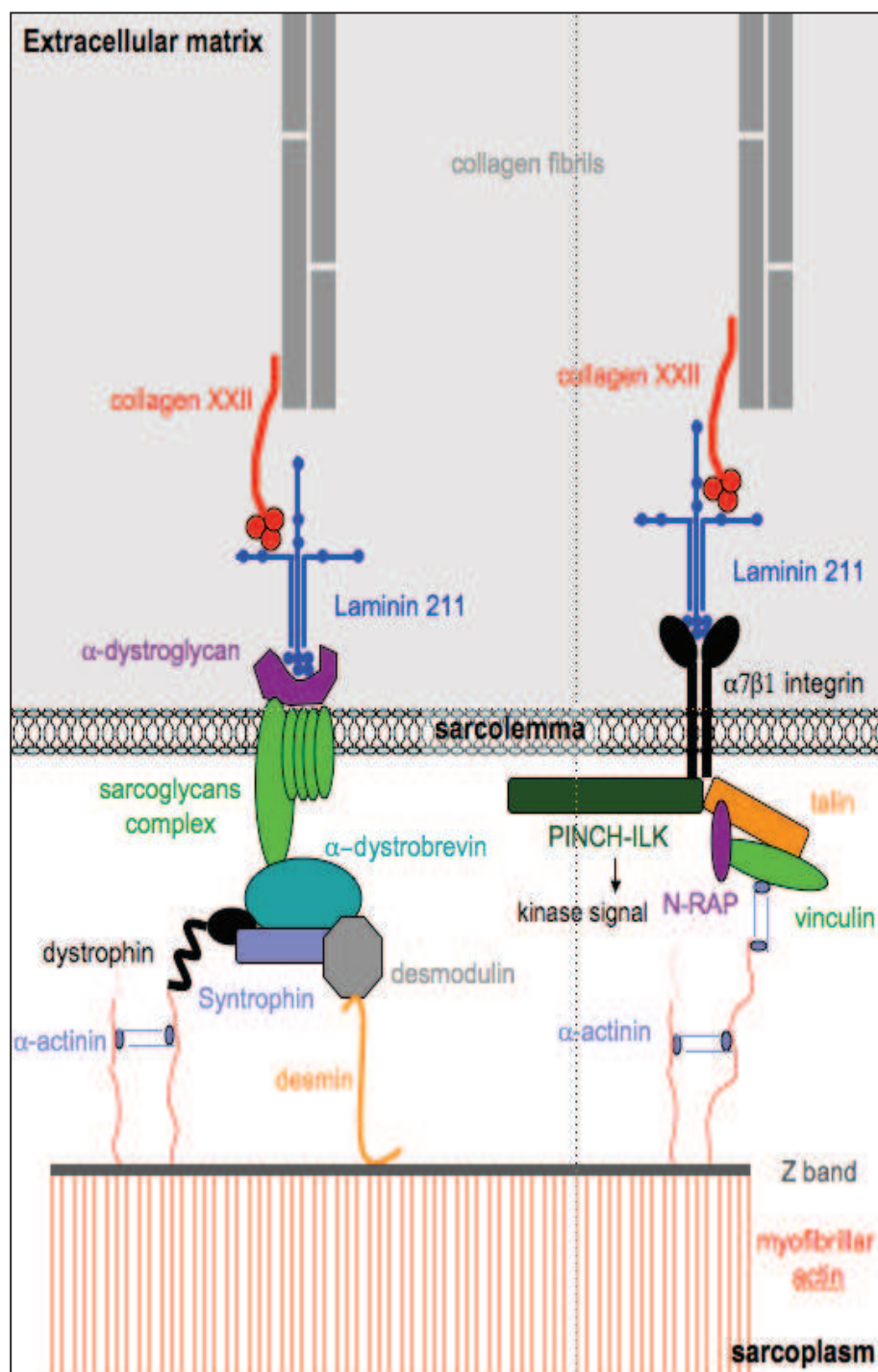


Figure 31 : Proposition d'un modèle hypothétique du rôle structurale du collagène XXII au sein de la JMT.



## 2. Le collagène XXII et les intégrines :

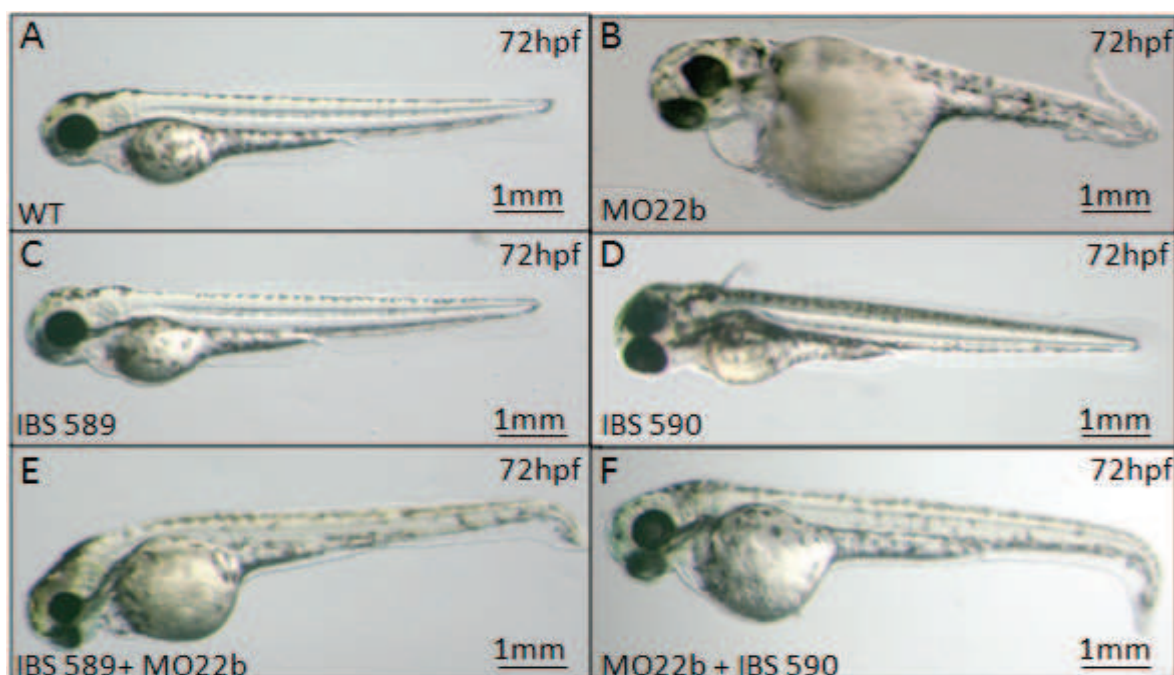
Les intégrines sont les récepteurs majoritaire des composant matriciels comme les collagènes (notamment les intégrines  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  et  $\alpha 11\beta 1$ ) et les laminines (notamment  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha 7\beta 1$ ). Les intégrines jouent à la fois un rôle structural par l'intermédiaire de la taline en connectant le cytosquelette des cellules à la MEC et un rôle de signalisation (Humphries *et al.*, 2006).

Il a été montré que les fibroblastes WI26 et les kératinocytes HACAT, exprimant les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$ , sont capable d'adhérer au collagène XXII (Koch *et al.*, 2004). Le laboratoire de M. Koch a identifié les sites de fixation aux intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  sur les domaines COL du collagène XXII, GFPGER et GFKGER nommés respectivement IBS 589 et IBS 590. Les régions contenant ces séquences ont été produites de façon recombinante sous forme de trimère chez *E. coli*. Les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  ne sont que très peu représentées dans le muscle (Bozyczko *et al.*, 1989) Ces polypeptides trimériques ont été injectées dans les embryons MO22 dans le but de rétablir une de voie signalisation intégrine-dépendante potentiellement affectée par l'absence de collagène XXII (figure 32).

L'injection des domaines IBS 589 et IBS 590 n'améliore pas le phénotype des morphants (figure 34). Il faudrait réaliser une étude plus fine du morphotype avant de conclure sur l'inefficacité des domaines IBS à améliorer le phénotype. L'activité des kinases ERK 1/2, activées par les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$ , n'est pas affectée chez les embryons MO22 (partie résultats, article III). Ces observations, corrélées à la faible présence de ces intégrines, confirment l'absence d'effet de l'injection des protéines recombinantes IBS 589 et 590 dans les MO22.

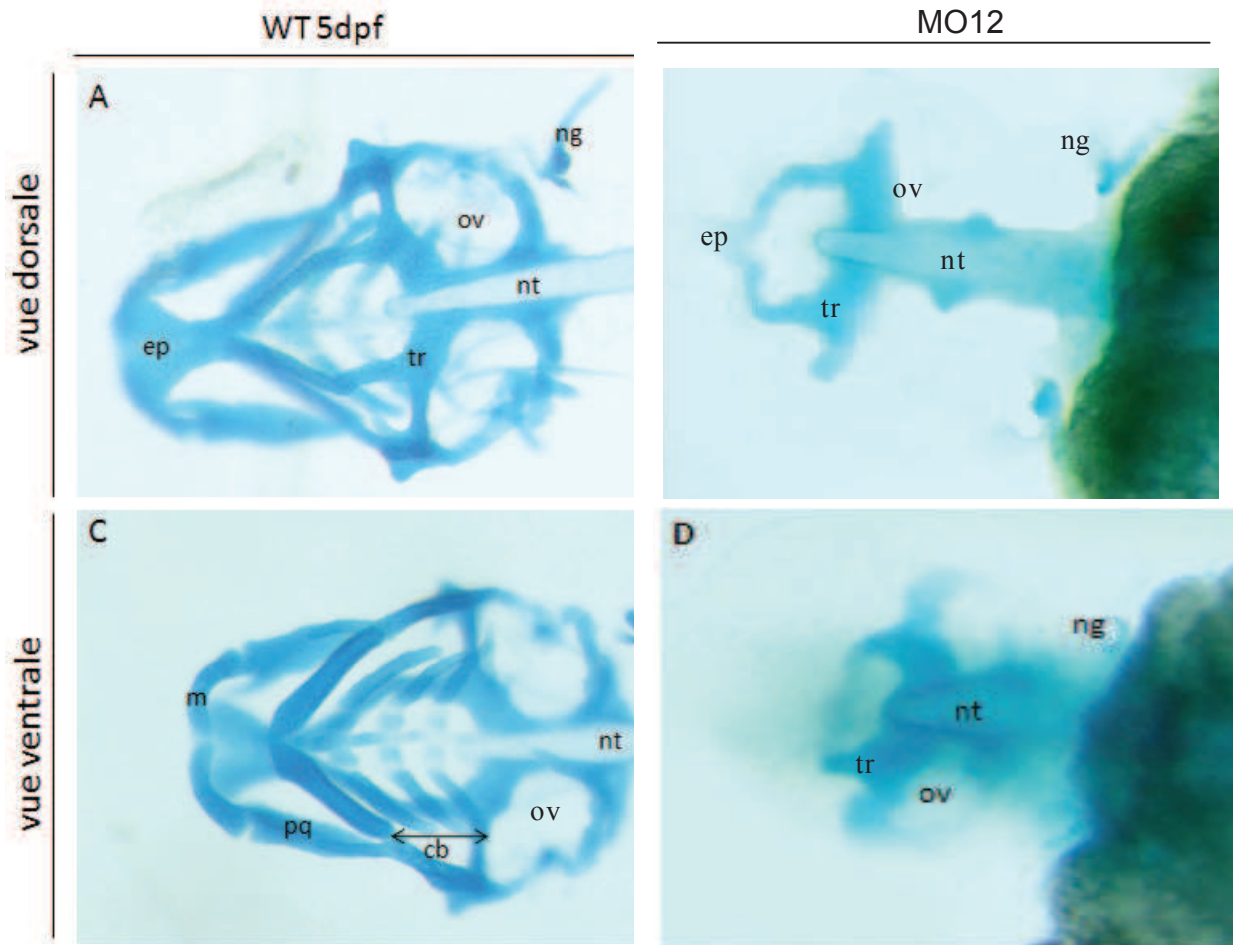
## II. Le collagène XXII et le développement du cartilage :

Le collagène XXII n'est pas exprimé au niveau des structures cartilagineuses de la tête chez l'embryon. Toutefois, à l'âge adulte, l'équipe de M. Koch a montré par immunofluorescence que les chondrocytes exprimaient le collagène XXII (résultats non montrés). De manière surprenante, la morphologie de la tête des morphants est affectée.



**Figure 32 : Co-injection du MO22 et des régions recombinantes de fixation aux intégrines du collagène XXII :** (A) Embryons sauvages. (B-D) Embryons injectés avec 8,5ng de MO22 (B), 0,15ng de IBS 589 (C) ou 0,15ng de IBS 590 (D). (E-F) Embryons co-injectés avec 8,5ng de MO22 + 0,15ng de IBS 589 (E) ou avec 8,5ng de MO22 + 0,15ng de IBS 590. Tous les embryons sont observés à 72hpf. (A-B) contrôles morphologiques. (C-D) contrôles de toxicité des protéines injectées. (E-F) Aucune amélioration du morphotype n'est observée chez les poissons co-injecté avec les domaines IBS 589 et 590. Résultats non publiés.

Pour vérifier la morphologie des structures cartilagineuses une coloration au bleu Alcian a été réalisée sur les MO22 (figure 33). Les structures cartilagineuses de la tête des morphants sont clairement désorganisées. Les arcs branchiaux et la mâchoire inférieure (cartilage de Meckel et le palatoquadrate) sont absents. La plaque éthmoïde et la trabeculea sont présentes mais atrophiées. Les structures des vésicules otiques sont localisables mais malformées. Enfin le développement des nageoires pectorales semble normal (figure 33). Cependant, il n'est pas impossible qu'une présence discrète du collagène XXII dans le cartilage existe. Il a d'ailleurs été montré que le collagène XXII pouvait être présent aux abords du cartilage chez la souris (Koch *et al.*, 2004).



**Figure 33 : Coloration au bleu Alcian des structures cartilagineuses d'embryons sauvages et MO22 de 5dpf :** Observations en vue dorsale (A et B) et ventrale (C et D) d'embryon sauvages (A et C) et MO22 (B et D). ep : plaque éthmoïde ; tr : trabecule, m : cartilage de Meckel, pq : palatoquadrate, cb : ceratobranchial, ov : vésicule otique, nt : notochorde, ng : nageoire.

# Conclusion générale et perspectives :

## **Conclusion générale et perspectives :**

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances concernant la morphogenèse de la JMT et son rôle dans l'intégrité du système musculo-tendineux en utilisant le modèle du poisson zèbre.

En effet, nous présentons ici le premier atlas retraçant le développement de la JMT, des étapes embryonnaires à l'organisation finale chez l'adulte. La conservation chez les vertébrés des aspects structuraux de la morphogénèse de la JMT, fait de cet atlas un outil intéressant pour toute étude sur la JMT. Ces résultats démontrent l'importance de l'interdépendance entre le muscle et le tendon dans la formation de cette jonction et du rôle des forces d'étirements et de compressions sur la morphogenèse conjointe du tissu musculo-tendineux.

Le laboratoire s'intéresse à comprendre le rôle des collagènes dans le développement embryonnaire, notamment ceux pour lesquels un modèle souris n'a pas été développé. Ainsi, depuis 5 ans, une exploration fonctionnelle a été réalisée sur différents collagènes chez le poisson zèbre dans le but de comprendre leur fonction et d'en définir les mécanismes et de générer des animaux modèles.

C'est dans ce cadre que le collagène XII a été caractérisé chez le poisson zèbre et le patron d'expression a été déterminé chez l'embryon, non seulement à l'échelle transcriptionnelle mais également protéique, ce qui est relativement rare dans les études de biologie de développement. Ce travail a permis d'identifier le collagène XII comme un excellent marqueur des fascias et des myoseptes. L'anticorps anti-collagène XII, qui a été généré durant ces travaux et dont j'ai déterminé la spécificité et les conditions d'utilisation, est un outil extrêmement intéressant qui permet de visualiser la MEC entourant tous les organes et permet de mettre en évidence les frontières tissulaires. Il se révèle également être un excellent marqueur du tendon.

Devant la sévérité globale du phénotype et le nombre d'organes affectés chez les morphants MO12, il nous a été impossible de déterminer avec précision le rôle du collagène

XII. La stratégie employée, de morpholino knockdown, semble inadapté pour cette étude. Des souris déficientes pour le collagène XII sont en cours de génération dans le laboratoire de M. Koch. Nous espérons que l'étude fonctionnelle sera, dans ce cas, facilitée. La possibilité de revoir la stratégie de knockdown à l'aide de morpholinos de traduction utilisée est aussi une piste à envisager, peut-être au regard des résultats qui seront obtenus chez la souris. En effet, une exploration fonctionnelle du collagène XII utilisant des morpholinos d'épissage dirigés contre différentes régions de ce collagène serait semble-t-il un moyen d'obtenir un phénotype plus ciblée sur un aspect de la fonction de ce collagène. Nous espérons ainsi déterminer la fonction *in vivo* de ce collagène qui reste aujourd'hui inconnue. De plus, nous avons montré au laboratoire que le collagène XII mais également le collagène XIV, de structure homologue, joueraient un rôle au cours de la régénération de la nageoire caudale de poisson zèbre. Nos résultats ont révélé une grande complémentarité dans les patrons d'expression des collagènes XII et XIV dans de nombreux tissus au cours du développement, dont les nageoires (Bader *et al*, en préparation). Les souris *coll4a1*<sup>-/-</sup> présentent un phénotype grossièrement normal. Il a été mis en évidence un défaut de fibrillogenèse et une altération des propriétés biomécaniques de la peau au cours du développement embryonnaire. Les tendons ne sont que très peu touchés (Ansorge *et al.*, 2009). Il sera très intéressant de comparer les phénotypes entre les souris déficientes pour le collagène XIV et celles déficientes pour le collagène XII.

Toujours dans l'idée d'utiliser le poisson zèbre comme outil de choix pour déterminer la fonction de nouveaux collagènes, nous avons entrepris l'étude du collagène XXII qui constitue le travail majeur de ma thèse. L'absence de marqueur de la JMT était jusqu'à présent le principal facteur limitant dans l'étude de la JMT. Nos observations chez le poisson zèbre, en accord avec ceux obtenus chez la souris (Koch *et al*, 2004) font du collagène XXII le premier marqueur du développement de cette structure. Nous possédons donc aujourd'hui des anticorps spécifiques des structures myotendineuses chez le poisson zèbre: le collagène XII pour le myosepte/tendon et le collagène XXII pour la JMT. L'utilisation de ces outils en association avec l'analyse phénotypique de différents mutants (*Sap*, *Caf*, *Dag1*,...) ainsi que l'utilisation de différents morpholinos comme les morpholinos dirigés contre la sous-unité  $\alpha 7$  des intégrines, seront précieux pour comprendre les processus moléculaires impliqués dans le développement de l'interface muscle/tendon.



L'étude concernant le collagène XXII que nous avons réalisée chez le poisson zèbre constitue la première étude fonctionnelle de ce collagène. Nos résultats montrent clairement qu'il joue un rôle structural contribuant ainsi à l'attachement du muscle à la MEC du tendon. L'absence de collagène XXII conduit à un phénotype dystrophique semblable à celui observé chez les mutants dystrophine (*sap*) et laminine  $\alpha 2$  (*caf*), gènes associés à des dystrophies chez l'humain. En cela, *col22a1* représente un gène candidat pour une des nombreuses dystrophies musculaires orphelines humaines. Dans ce contexte, il est intéressant de faire un parallèle entre l'immobilité embryonnaire des morphants MO22, et les symptômes arthrogryaux caractérisés par l'immobilité des fœtus. Dans cette optique, une recherche de mutations chez des cohortes de patients sélectionnés a été entreprise en collaboration avec le Dr V. Allamand (Paris) et le Prof J. Lunardi (Grenoble).

Nous essayerons également d'identifier des voies de signalisation impliquées dans le développement de la JMT. Pour cela nous ciblerons deux types de facteurs importants révélés par notre étude, les molécules de signalisation extracellulaires (facteurs FGF 4 et 8) et les forces de compression/étirement au cours du développement embryonnaire (AKT, ERK1/2, SCX,...). Il serait dans ce cadre intéressant de connaître les conséquences de l'activité contractile du muscle sur l'expression du collagène XXII. Ces analyses sont certainement assez délicates à réaliser sur les embryons de poisson zèbre. Une première approche pourrait être réalisée sur un modèle cellulaire, en utilisant par exemple la lignée myogénique C2C12.

## Références Bibliographiques :

**Amthor H, Christ B, Weil M, Patel K (1998)** Importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol.* 8, 642, 652.

**Anderson, DM, Beres BJ, Wilson-Rawls J, Rawls A (2009)** The homeobox gene *Mohawk* represses transcription by recruiting the Sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev. Dyn.* 238, 572-580.

**Ansorge HL, Meng X, Zhang G, Veit G, Sun M, Klement JF, Beason DP, Soslowsky LJ, Koch M, Birke DE (2009)** Type XIV collagen regulates fibrillogenesis: premature collagen fibril growth and tissue dysfunction in null mice. *J. Biol. Chem.* 284, 8427-8438.

**Aumailay M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hoenester E, Jones JCR, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen J, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005)** A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 24, 326-332.

**Azizi E, Gillis GB, Brainerd EL (2002)** Morphology and mechanics of myosepta in a swimming salamander (*Siren lacertina*). *CBP.* 133, 967-978.

**Baker LP, Daggett DF et Peng HB (1994)** Concentration of pp125 focal adhesion kinase (FAK) at the myotendinous junction. *J. Cell. Sci.* 107, 1485-1497.

**Baas D, Malbouyres M, Haftek-Terreau Z, Le Guellec D, Ruggiero F (2009)** Craniofacial cartilage morphogenesis required colXia1 activity. *Matrix Biol.* 28, 490-502.

**Bader H, Keene D, Charvet B, Viet G, Driever W, Koch M, Ruggiero F (2009)** Zebrafish collagen XII is present in embryonic connective tissues sheaths (facia) and basement membrane. *Matrix Biol.* 28, 32-43.

**Barresi MJF, Devoto SH, Stickney H (2000)** The zebrafish slow-muscle-omitted gene product is required for hedgehog signal transduction and development of slow muscle identity. *Development.* 127, 2189-2199.

**Bassett DI, Bryson-Richardson RJ, Daggett DF, Gautier P, Keenan DG, Currie PD (2003)** Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development.* 130, 5851-5860.

**Bassett DI, Currie PD (2003)** The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum. Mol. Gent.* 12, 265-270.

**Beck K and Brosky B (1998).** Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled-coil. *J Struct Biol.* 122, 17-29.

**Bell SE, Mavila A, Salazar R, Bayless KJ, Kanagala S, Maxwell SA, Davis GE (2001)** Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *J. Cell. Sci.* 114, 2755-2773.

**Benjamin M, Toumi H, Ralph JR, Bydder G, Best TM, Milz S (2008)** Where tendon and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J. Anat.* 208, 471-490.

**Benjamin M, Ralphs JR (2000)** The cell and developmental biology of tendon and ligament. *Int Rev Cytol.* 196, 85-130.

**Bertini E, Pepe G (2002)** collagen type VI and related disorders: Bethlem myopathy and Ullrich sclerotic muscular dystrophy. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 6, 193-198.

**Bill BR, Petzold A, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC (2009)** A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish.* 6, 69-77.

**Birk DE (2001)** Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulations of fibril assembly. *Micron.* 32, 223-237.

**Birk DE, Mayne E (1997)** Localization of collagens types I, III and V during tendon development. Changes in collagens types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J Cell Biol.* 72, 352-361.

**Birk DE, Nurminskaya MV, Zychband EI (1995)** Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev Dyn.* 202, 229-243.

**Blagden CS, Currie PD, Ingham PW, Hughes SM (1997)** Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by sonic hedgehog. *Genes Dev.* 11, 2163-2175.

**Boehme K, Yefu Li Y, Paul S, Oh PS, Bjorn R, Olsen BR (1995)** Primary structure of the long and short splice variants of mouse collagen XII and their tissue-specific expression during embryonic development. *Dev Dyn.* 204, 432-445.

**Böhem T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997)** Anti-angiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* 390, 404-407.

**Bonod-Bidaud C, Beraud M, Vaganay E, Delacoux F, Font B, Hulmes DJ., Ruggiero F (2007)** Enzymatic cleavage specificity of the pro $\alpha$ 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem J.* 405:299-306.

**Boot-handford RP, Tuckwell DS, Plumb DA, Rock CF, Poulson R (2003)** A novel and highly conserved collagen (pro $\alpha$ 1(XXVII)) with a unique expression pattern and and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem.* 278, 31067-31077

**Boudko SP, Engel J, Bächinger HP (2008)** Trimerization and triple helix stabilization of the collagen XIX NC2 domain. *J. Biol. Chem.* 283, 34345-34351.

**Bozyczko D, Decker C, Muschler J, Horwitz AF (1989)** Integrin on developing and adult skeletal muscle. *Exp. Cell. Res.* 183, 72-91.

- Brent AE, Schweitzer R, Talbin CJ (2003)** A somatic compartment of tendon progenitor. *Cell*. 113, 245-248.
- Brent AE, Tabin CJ (2004)** Fgf acts directly on the somatic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate the scleraxis expression. *Development*. 131, 9885-3896.
- Brent AE, Braun T, Tabin CJ (2005)** Genetic analysis of interactions between somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development*. 132, 515-528.
- Breton S, Pagnon-Minot A, Guillon E, Ruggiero F, Le Guellec (2010)** Characterization of spatial and temporal expression pattern of Col15a1b during zebrafish development. *GEP*. Accepté.
- Brodsky B, Persikov AV (2005)** Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein chem*. 70, 301-39.
- Buckingham M (2001)** Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Gen. Dev*. 4, 440-448.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F (2003)** The formation of skeletal muscle: from tendon to limb. *J Anat*. 202, 59-68.
- Burridge K, Turner CE, Romer LH (1992)** Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: A role in cytoskeletal assembly. *J. Cell. Biol*. 119, 893-903.
- Canty EG, Kadler KE (2005)** Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell. Sci*. 118, 1341-1353.
- Camacho-Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, Giusti B, Chu ML, Pepe G (2001)** Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutation in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 7516-7521.
- Chapman VM, Miller DM, Armstrong D, Caskey CT (1989)** Recovery of induce mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 86, 1292-1296.
- Chevallier A, Kieny M, Mauger A (1977)** Limb-somite relationship: origin of limb musculature. *J Embryom Exp Morphol*. 41, 245-258.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2005)** Connective tissues: signaling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*. 36, 1085-1089.
- Chou MY and Li HC (2002)** Genomic organization and characterization of the human type XXI collagen (COL21A1) gene. *Genomics*. 79, 395-401.
- Clark AK, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002)** Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18, 637-706.
- Cohn, RD, Campbell KP (2000)** Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 23,1456-1471.

- Colorado PC, Torres A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi H, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simon M, Post M, Kufe DW, Weishelbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R (2000)** Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 60, 2520-2526.
- Cortes F, Daggett D, Bryson-Richardson RJ, Neyt C, Maule J, Gautier P, Hollway GE, Keenan D, Currie PD (2003)** Cadherin-mediated differential cell adhesion controls slow muscle cell migration in the developing zebrafish myotome. *Dev. Cell.* 5, 865-876.
- Crawford BD, Henry CA, Clason TA, Becker AL, Hille MB (2003)** Activity and distribution of Paxillin, Focal Adhesion Kinase and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.*
- Crossley PH, Minowada G, McArthur CA, Martin GR (1996)** Role for Fgf8 in induction, initiation and maintenance of chick limb development. *Cell.* 84, 127-136.
- Dale JK, Maroto M, Dequeant ML, Malapert P, McGrew M, Pourquié O (2003)** Periodic Notch inhibition by lunatic fringe underline the chick segmentation clock. *Nature.* 421, 275-278.
- De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefevre O, Kedingner M, Simon-Assmann P (1996)** Inhibition of laminin alpha1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J. Cell Biol.* 133, 417-430.
- De Castro Rodriguez A, Schmalbruch H (1995)** Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscle. *The Anatomical Record.* 243, 230-237.
- Demier E, Ferreira A, Sabatielli P, Allamand V, Makri S, Echenne B, Maraldi M, Merlilni L, Topaloglu H, Guicheney P (2004)** Collagen VI status and clinical severity in Ullrich congenital muscular dystrophy: phenotype analysis of 11 families linked to the COL6 loci. *Neuropediatrics.* 35, 103-112.
- Den Hertog J (2005)** Chemical genetics: drug screens in zebrafish. *Biosci. Rep.* 25, 289-297.
- Desaki, J (1992)** Scanning electron microscopical study of skeletal muscle fiber ends in normal and dystrophic mice. *Arch Histol Cytol.* 55, 449-452.
- Devoto SH, Melancon E, Eisen JS, Westerfield M (1996)** Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development.* 122, 3371-3380.
- Doane KJ, Birk DE (1991)** Fibroblast retain their tissue phenotype when grown in three-dimensional collagen gels. *Exp Cell Res.* 195, 432-442.
- Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM (2006)** Anatomie pour les étudiants (Gray's anatomy book). *Elsevier.*
- Du SJ, Devoto SH, Westerfield M, Moon R (1997)** Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF- $\beta$  gene families. *J. Cell. Biol.* 139, 145-156.



**Dubois GM, Hafftek Z, Crozet C, Garrone R, Le Guellec D (2002)** Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for  $\alpha 2$  type I collagen of zebrafish. *Gene*. 294, 55-65.

**Dolez M, Nicolas JF, Hirsinger (2011)** Laminins, via heparan sulfate proteoglycans, participate in zebrafish myotome morphogenesis by modulating the pattern of Bmp responsiveness. *Development*. 138, 97-106.

**Ebladie MC, Luun JS, Dickson RJ, Münsterberg AE, Sanz-Esquirro JJ, Farell ER, Mathers J, Keyse SM, Storey K, Tickle C (2003)** Negative feedback regulation of Fgf signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol*. 13, 1009-1018.

**Edom-Vovard F, Bonnin MA, Duprez D (2001)** Fgf8 transcripts are located in tendons during embryonic chick limb development. *Mechanisms of development*. 108, 203-206.

**Edom-Vovard F, Duprez D (2004)** Signals regulating tendon formation during chick embryonic development. *Dev Dyn*. 229, 449-457.

**Edom-Vovard F, Schuler B, Bonnin MA, Teillet MA, Duprez D (2002)** Fgf 4 positively regulates scleraxis and tenascin expression in chick limb tendons. *Dev Biol*. 247, 351-366.

**Eisen JS, Smith JC (2008)** Controlling morpholino experiments: don't stop making antisens. *Development*. 135, 1735-1743.

**Ekker M, Wenger J, Akimenko MA, Westerfield M (1992)** Coordinate embryonic expression of the three engrailed genes. *Development*. 116, 1001-1010.

**Eklund L, Piuhola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, Fassler R, Muona A, Ilves M, Ruskohao H, Takala TE, Pihlajaniemi T (2001)** Lack of type XV collagen cause a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 204, 361-372.

**Elliott DH (1965)** Structure and function of mammalian tendon. *Biol Rev Philos Soc*. 40, 392-421.

**Engvall E, Wewer UM (2003)** The new frontier in muscular dystrophy research: booster genes. *FASEB J*. 17, 1579-1584.

**Fayssol A, Nardi O, Orlikowski D, Annane D (2010)** Cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy: pathogenesis and therapeutics. *Heart Fail Rev*. 15, 103-107.

**Felsenfeld AL, Walker C, Westerfield M, Kimmel CB, Steisinger G (1990)** Mutation affecting skeletal muscle myofibril structure in zebrafish. *Development*. 108, 443-459.

**Felsenfeld AL, Kimmel CB, Curry M (1991)** The *fub-1* mutation block initial myofibril formation in zebrafish muscle pioneer cells. *Dev. Biol*. 148, 23-30.

**Ferreiro A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Geomans N, Bönnemann C, Jungbluth H, Straub V, Villanova M, Leroy PJ, Romero NB, Martin JJ, Muntoni F, Voit T, Estournet B, Richard P, Fardeau M, Guicheney P (2002)** Mutations of the selenoprotein N gene,

which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 739-749.

**Filipe G (1998)** Arthrogryposes. *Encycl Méd Chir.* 15, 201-210.

**Fitzerald J, Bateman JF (2001)** A new FACIT of the collagen family: COL21A1. *FEBS letters.* 505, 275-280.

**Font B, Eichenberger D, Rosenberg LM, Van Der Rest M (1996)** Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol.* 15, 341-348.

**Furuta Y, Ilic D, Kanawaza S, Takeda N, Yamamoto T, Aizawa S (1995)** Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene.* 11, 1989-1995.

**Gajewski M, Sieger D, Alt B, Leve C, Hans S, Wolff C, Rohr KB, Tauz D (2003)** Anterior and posterior wave of cyclic *her1* gene expression are differentially regulated in the presomitic mesoderm of zebrafish. *Development.* 130, 4269-4278.

**Gara SK, Grumati P, Urciuolo A, Bonaldo P, Kobbe B, Koch M, Paulsson M, Wagener R (2008)** Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *J. Biol. Chem.* 283, 10658-10670.

**Geier C, Perrot A, Özcelik C, Binner P, Counsell D, Hoffmann K, Pilz B, Martiniak Y, Gehmlich K, Van der Ven PFM, Fürst DO, Vornwald A, von Hohenberg E, Nürnberg P, Scheffold T, Dietz R, Osterziel KJ (2003)** Mutation in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 107, 1390-1395.

**Gheyara AL, Vallejo-Illarramendi A, Zang K, Mei L, Saint-Arnaud R, Dedhar S, Reichardt LF (2007)** Deletion of integrin linked kinase from skeletal muscle of mice resembles muscular dystrophy due to  $\alpha 7\beta 1$  integrin deficiency. *Am. J. Pathol.* 171, 1966-1977.

**Gillis JM (2004)** Guérir la myopathie de Duchenne par l'utrophine ? *Médecine Science.* 20, 442-447.

**Gilmore AP, Romer LH (1996)** Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol. Biol. Cell.* 7, 1209-1224.

**Gompel N, Cubedo N, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudière C, Ghysen A (2001)** Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mechanisms of development.* 105, 69-77.

**Gordon MK, Gerecke DR, Dublet B, van der Rest M, Olsen BR (1989)** Type XII collagen: a large multidomain molecule with partial homology to type IX collagen. *JBC.* 264, 19772-19778.

**Grady RM, Akaaboune M, Cohen AL, Maimone MM, Lichtman JW, Sanes JR (2003)** Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated isoforms of alpha-dystrobrevin: role in skeletal muscle and in neuromuscular and myotendinous junctions. *J Cell Biol.* 160, 741-752.

**Granato M, van Edeem FJM, Schach U, Trowe T, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nüsslein-Volhard C (1996)** Gene controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development.* 123, 399-413.

**Grounds MD, Sorokin L, White J (2005)** Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand J Med Sci Sports.* 338, 467-477.

**Groves JA, Hammond CL, Hughes SM (2005)** Fgf8 drives myogenic progression of a novel lateral fast muscle fiber population in zebrafish. *Development.* 132, 4211-4222.

**Gupta V, Kawahara G, Grundy ST, Chen At, Lencer WI, Zhou Y, Zon LI, Kunkel LM, Beggs AH (2011)** The zebrafish *dag1* mutant: A novel genetic model for dystroglycanopathies. *HMG advance access published.*

**Guyon, JR, Mosley AN, Jun SJ, Montanaro F, Steffen LS, Zhou Y, Nigro V, Zon LI, Kunkel LM (2005)** Delta-sarcoglycan is required for early zebrafish muscle organization. *Exp Cell Res.* 304, 105-115.

**Guyon JR, Steffen LS, Howell MH, Pusack TJ, Lawrence C, Kunkel LM (2007)** Modeling human muscle disease in zebrafish. *Bioch. Biophys. Act.* 1772, 205-215.

**Haftek Z, Morvan-dubois G, Thisse B, Thisse C, Garrone R, Le Guellec D (2003)** Sequence and embryonic expression of collagen XVIII NC1 domain (endostatin) in the zebrafish. *Gene Exp Patterns.* 3, 351-354.

**Hall E, Bryson-Richarson RJ, Berger S, Jacoby AS, Cole NJ, Hollway GE, Berger J, Currie PD (2007)** The zebrafish *candyfloss* mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin  $\alpha 2$ -deficient congenital muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 7092-7097.

**Hatta K, BreMiller RA, Westerfield M, Kimmel CB (1991)** Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development.* 112, 821-832.

**Haut TL, Haut RC (1997)** The state of tissue hydration determines the strain rate sensitive stiffness of human patellar tendon. *J Biomech.* 30, 79-81.

**Hayashi YK, Chou FL, Engvall E, Ogawa M, Matsuda C, Hirabayashi S, Yokoshi K, Zlober BL, Kramer RH, Kaufman SJ, Ozawa E, Goto Y, Nonaka I, Tsukahara T, Wang J, Hoffman EP, Arahata K (1998)** Mutation in the integrin  $\alpha 7$  gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* 19, 94-97.

**Hirata H, Watanabe T, Hatakeyama J, Sprague SM, Saint-Amant L, Nagashima A, Cui WW, Zhou W, Kuwada JY (2007)** Zebrafish *relatively relaxed* mutants have a ryanodine receptor defect, show slow swimming and provide a model of multi-minicore disease. *Development.* 134, 2771-2781.

- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tomé FMS, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, Guicheney P (1995)** Mutation in the laminin alpha2-chain gene (LAMA2) cause merosin congenital dystrophy. *Nat. Genet.* 11, 216-218.
- Henry CA, Amacher SL (2004)** Zebrafish slow muscle migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev Cell.* 7, 917-923.
- Henry CA, Crawford BD, Yan YL, Postelwait, Cooper MS, Hille MB (2001)** Role for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Dev. Biol.* 240, 474-487
- Henry CA, McNulty IM, Durst WA, Munchel SE, Amacher SL (2005)** Interaction between muscle fibers and segment boundaries in zebrafish. *Dev Biol.* 287, 346-360.
- Henry CA, Urban MK, Dill K, Merlie JP, Page MF, Kimmel CB, Amacher SL (2002)** Two linked *hairy/Enhancer of split*-related zebrafish gene, *her1* and *her7*, function together to refine alternating somite boundaries. *Development.* 129, 3693-3704.
- Hirsinger E, Stellabotte F, Devoto SH, Westerfield M (2004)** hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev Biol.* 275, 143-157.
- Holley SA, Takeda H (2002)** Catching a wave: the oscillator and wavefront that create the somite. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 13, 481-488.
- Holley SA, Geisler R, Nüsslein-Volhard C (2000)** Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by the delta-dependant oscillator and independant wavefront activity. *Gene Dev.* 14, 1678-1690.
- Hollway GE, Currie PD (2003)** Myotome meanderings. Cellular morphogenesis and the making of muscle. *EMBO report.* 4, 855-860.
- Hollway GE, Bryson-Richardson RJ, Berger S, Cole NJ, Hall TE, Curries PD (2007)** Whole somite rotation generates muscle progenitor cell compartments in the developing zebrafish embryo. *Dev Cell.* 207-219.
- Huang CC, Hall DH, Hedgecock EM, Kao G, Karantza V, Vogel BE, Hutter H, Chisholm AD, Yurchenco PD Wadsworth WG (2003)** Laminin alpha subunits and their role in *C. elegans* development. *Development.* 130, 3343-3358.
- Hudziak RM, Barofsky E, Barofsky DF, Weller DL, Hang SB, Weller DD (1996)** Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisens Nucl. Acid. Drug. Dev.* 6, 267-272.
- Humphries JD, Bryon A, Humphries MJ (2006)** Integrin ligand at a glance. *J. Cell. Sci.* 119, 3901-3903.
- Hynes RO (2004)** The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol.* 23, 333-340.

- Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J., Okada M, Yamamoto T (1995)** Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 377, 539-544.
- Im, WB, Phelps SF, Copen EH, Adams EG, Slingtomb JL, Chamberlain JS (1996)** Differential expression of dystrophin isoform in strains of mdx mice with different mutation. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1149-1153.
- Ingham PW (2009)** The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet.* 18,107-112.
- Ingham PW, Kim HR (2005)** Hedgehog signalling and the specification of muscle cell identity in the zebrafish embryo. *Exp Cell Res.* 306, 336-342.
- Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin L, Bressan GM, Bernardi P, Bolano P (2003)** Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet.* 35, 367-371.
- Ito Y, Yoshitaka T, Uneo-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H (2010)** The *Mohawk* homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 10538-10542.
- Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB (2003)** Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of notch signaling by delta. *Dev. Cell.* 4:67-82.
- Jiang YJ, Brand M, Heisenberg CP, Beuchle D, Furutani-Seiki M, Kelsh RN, Warga RM, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane D, Mullins MC, Odenthal J, van Eeden FJM, Nüsslein-Vohland (1996)** Mutation affecting neurogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development.* 123, 205-216.
- Jöbsis GJ, Keiser H, Vreijling JP, de Visser M, Speer MC, Wolterman RA, Baas F, Bolhuis PA (1996)** Type VI collagen mutation in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contracture. *Nat. Genet.* 14, 113-115.
- Johnston IA, McLay HA, Abercromby M, Robins D (2000)** Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellites cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. *J. Exp. Biol.* 203, 2539-2552.
- Jòzas L, Kannus P (1997)** Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sport.* 7, 113-118.
- Kadler K (1995)** Extracellular matrix 1: fibril-forming collagens. *Protein Profile* 2(5), 491-619.
- Kannus 2000,** Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sport.* 10, 312-320.

- Kao G, Huang CC, Hedgecock EM, Hall DH, Wadsworth WG (2006)** Role of the laminin  $\beta$  subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 290, 211-219.
- Kimmel CB, Warga RM, Schilling TF (1990)** Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development.* 108, 581-594.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995)** Stage of embryonic development of zebrafish. *Dev Dyn.* 203, 253-310.
- Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torres A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R (2000)** Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem.* 275, 1209-1215.
- Kassner A, 1, Hansen U, Miosgeb N, Reinhardt DP, Aigner T, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P, Grässel S (2003)** Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* 22, 131-143.
- Kastelic J, Galeski A, Baer E (1978)** The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res.* 6, 11-23.
- Kawahara G, Guyon JR, Nakamura Y, Kunkel LM (2010)** zebrafish models for FKRП muscular dystrophies. *Hum Mol Genet.* 19, 623-633.
- Kawakami Y, Rodriguez-Léon J, Koth CM, Büsher D, Itoh T, Raya À, Ng JK, Esteban CR, Takahashi S, Henrique D, Schwartz MF, Asahara H, Belmonte JCI (2003)** MPK3 mediates the cellular response to Fgf8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol.* 5, 513-519.
- Keene DR, Lunstrum GP, Morris NP, Stoddard DW, Burgeson RE (1991)** Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J. Biol. Chem.* 113, 171-178.
- Ker ED, Chu B, Phillippi JA, Gharaibeh B, Huard J, Weiss LE, Campbell PG (2011)** Engineering spatial control of multiple differentiation fates within a stem cell population. *Biomaterials.* 32,3413-3422.
- Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M (1999)** Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sport Med.* 6, 393-408.
- Kieny M, Chevallier A (1979)** Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. *J Biol Exp Morph.* 49, 153-165.
- Kimmel CB, Warga RM, Kimmel SR, Ullman B, Schilling TF (1995)** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 203, 253-310.
- Kjaer M (2004)** Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 84, 649-698.



- Kjaer M, Langberg H, Magnusson P (2003)** [Overuse injuries in tendon tissue: insight into adaptation mechanisms]. *Ugeskr Laeger*. 165, 1438-1443.
- Koch M, Bernasconi C, Chiquet M (1992)** A major oligomeric fibroblast proteoglycan identified as a novel large form of type XII collagen. *Eur. J. Biochem*. 207, 847-856.
- Koch M, Bohrmann B, Matthison M, Hagios C, Trueb B, Chiquet M (1995)** Large and small splice variants of collagen XII: differential expression and ligand binding. *J. Biol. Chem*. 130, 1005-1014.
- Koch M, Olson PF, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud MF (1999)** Characterization and expression of laminin  $\gamma 3$  chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol*. 145, 605-617.
- Koch M, Laub F, Zhou P, Hahn RA, Tanaka S, Burgeson RE, Gerecke DR, Ramirez F, Gordon MK (2003)** Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone. *J Biol Chem* 278, 43236-43244.
- Koch M, Schulze J, Hansen U, Ashwadt T, Keene DR, Bruncken WJ, Burgeson RE, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L (2004)** A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J Biol Chem* 279, 22514-22521.
- Kostrominova TY, Clave S, Arruda EM, Larkin LM (2009)** Ultrastructure of myotendinous junctions in tendon-skeletal muscle constructs engineered *in vitro*. *Histol Histopathol*. 24, 541-550.
- Kramer RH, Vu MP, Cheng Y-F, Ramos DM, Timpl R, Waleh N (1991)** Laminin-binding integrin  $\alpha 7 \beta 1$ : functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regulation*. 2, 805-817.
- Kuo HJ, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW (1996)** Type Vi collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *JBC*. 272, 26522-26529.
- Kvist M, Hurme T, Kannus P, Järvinen T, Maunu VM, Jozsa L, Järvinen M (1995)** Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *Am. J. Sport Med*. 23, 359-364.
- Lacy DB, Wigelsworth HM, Scobie HM, Young JAT, Collier RJ (2004)** Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: An anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 6367-6372.
- Lai Y, Yue Y, Liu M, Ghosh A, Engelhardt JF, Chamberlain JS, Duang D (2005)** Efficient *in vivo* gene expression by *trans*-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat. Biotechnol*. 23, 1435-1439.
- Lamandé SR, Shields KA, Kornberg AJ, Shield LK, Bateman JF (1999)** Bethlem myopathy and engineered collagen VI triple helical deletions prevent intracellular multimer assembly and protein secretion. *JBC*. 274, 21817-21822.
- Lampe AK, Bushby KM (2005)** Collagen VI related muscle disorders. *J. Med. Genet*. 42, 673-685.

- Law DJ, Tidball JG (1993)** Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defect in pre-necrotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am J Pathol.* 142, 1513-1523.
- Le Guellec D, Morvan-Dubois G, Syr JY (2004)** Skin development in Bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol.* 48, 217-231.
- Lejard V, Blais F, Guerquin MJ, Bonnet M, Bonnin MA, Havis E, Malbouyres M, Bonod Bidaud C, Maro G, Gilardi-Ebenstreit, Rossert J, Ruggiero F, Duprez D (2011)** EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *Sous presse.*
- Lewis KE, Eisen JS (2004)** Paraxial mesoderm specifies zebrafish primary motoneuron subtype identity. *Development.* 13, 891-902.
- Leyten QH, Gabreëls FJM, Renier WO, ter Laak HJ (1998)** Congenital muscular dystrophy: a review of the literature. *Clinical Neurology and Neurosurgery.* 98, 267-280.
- Li F, Zhang Y, Wu C (1999)** Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J Cell Sci.* 112, 4589-4599.
- Lisi MT, Cohn RD (2007)** Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 159-172.
- Lieschke GJ, Currie PD (2007)** Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353-367.
- Lincoln J, Lange AW, Yutzey KE (2006)** Hearts and bones: Shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon and bone development. *Dev Biol.* 294, 292-302.
- Ling Y, Yang Y, Lu N, You Q, Wang S, Gao Y, Chen Y, Guo QL (2007)** Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 361, 79-84.
- Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D (2005)** Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young *mdx* muscle from contraction induced injury. *Molecular Therapy.* 11, 245-256.
- Luo G, Herrera AH, Horowitz R (1999)** Molecular interaction of N-RAP, a nebulin-related protein of striated muscle myotendon junction and intercalated disks. *Biochemistry.* 38, 6135-6143.
- Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, Kahn CR, Sonenberg N, Hynes RO, Kalluri R (2000)** Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *Bio Chem.* 275, 21340-21348.
- Malfait F, Wenstrup RJ, De Paepe (2010)** Clinical and genetic aspect of Ehler-Danlos syndrome, classic type. *GeneTest.* 12, 597-604.

- Maves L, Waskiewicz AJ, Paul B, Cao Y, Tyler A, Moens CB, Tapscott SJ (2007)** Pbx homeodomain proteins direct Myod activity to promote fast-muscle differentiation. *Development*. 134, 3371-3382.
- Mayer U, Saher G, Fässler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, Miosge N, Pölshl E, von der Mark K (1997)** Absence of integrin alpha 7 cause a novel form of muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 17, 318-323.
- Mazzorana M, Cogne S, Goldschmidt D, Aubert-Foucher E (2001)** Collagenous sequence governs the trimeric assembly of collagen XII. *J. Biol. Chem.* 276, 27989-27998.
- McMahon AP, Giebelhaus DH, Champion JE, Bailes JA, Lacey S, Carritt B, Henchman SK, Moon RT (1987)** cDNA cloning, sequencing and chromosome mapping of a non-erythroïde spectrin, human alpha-fodrin. *Differentiation*. 34, 241.
- McNeilly CM, Banes AJ, Ralphs BM (1996)** Tendon cells *in vivo* form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat.* 189-593-600.
- Meeker ND, Hutchinson SA, Ho L, Trede NS (2007)** Methode for isolation of PCR ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques*. 43, 610-614.
- Milz S, McNeilly C, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M (1998)** Fibrocartilages in the extensor tendons of the interphalangeal joints of human toes. *Anat. Rec.* 252, 264-270.
- Milz S, Benjamin M, Putz R (2005)** Molecular parameters indicating adaptation to mechanical stress in fibrous connective tissue. *Adv Anat. Embryol. Cell. Biol.* 63, 1015-1021.
- Miosge N, Klenczar C, Herken R, Mayer U (1999)** Organisation of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha 7 beta 1 integrin. *Lab Invest.* 79, 1591-1599.
- Mohamed JS, Boriek AM (2010)** Stretch augments TGF-beta1 expression through RhoA/ROCK1/2, PTK, and PI3K in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 299, 413-424.
- Morvan-Dubois G, Le Guellec D, Garrone R, Zylberberg L, Bonnaud L (2003)** Phylogenetic analysis of vertebrate fibrillar collagen locates the position of zebrafish alpha3(I) and suggests an evolutionary link between collagen alpha chains and hox cluster. *J Mol Evol.* 57, 501-514.
- Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin CJ, Schweitzer R (2007)** Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development*. 134, 2697, 2708.
- Myers JC, Sun MJ, D'Ippolito JA, Jabs EW, Neilson EG, Dion AS (2003)** Human cDNA clones transcribed from an unusually high-molecular-weight RNA encode a new collagen chain. *Gene*. 123,- 211-217.
- Myllyharju J, Kivirikko K, (2004)** Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *TRENDS in genetics*. 20, 33-34.

**Nishiyama T, McDonough A, Bruns RR, Burgeson RE (1994)** Type XII and XIV collagens mediated interactions between banded collagen fibers *in-vitro* and may modulate extracellular matrix deformability. *JBC*. 45, 28193-28199.

**Nurminiskaya MV, Birk DE (1998)** Differential expression of gene associated with collagen fibril growth in the chicken tendon: Identification of structural and regulatory gene by subtractive hybridization. *Archives of biochemistry and biophysics*. 350, 1-9.

**O'Hagan RC, Tozier RG, Symon M (1996)** The activities of Ets transcription factor Pea3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene*. 13, 1323-1333.

**O'Hagan RC, Hassell JA (1998)** The Pea3 Ets transcription factors is a downstream target of HER2/Neu receptor tyrosin kinase. *Oncogene*. 16, 301-310.

**Oliver G, Wehr R, Jenkins NA, Copeland NG, Cheyette BNR, Hartenstein V, Zipursky SL, Gruss P (1995)**. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*. 121, 693-705.

**Pace JM, Corrado M, Missero C, Byers PH (2003)** Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1. *Matrix Biol*. 22, 3-14.

**Pagnon-Minot A, Malbouyres M, Haftek-Terreau Z, Kim R, Takako S, Thisse B, thisse C, Ingham PW, Ruggiero F, Le Guellec D (2008)** Collagen XV, a novel factor in zebrafish notochord differentiation and muscle development. *Dev Biol*. 316, 21-35.

**Parson MJ, Campos I, Hirst EMA, Stemple DL (2002)** Removal dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development*. 129, 3505-3512.

**Parsons MJ, Pollard SM, Saude L, Feldman, Coutinho P (2002)** Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development*. 129, 3137-3146.

**Pegoraro E, Cepollaro F, Prandini P, Marin, Fanin M, Trevisan CP, El-Messlemani AH, Tarone G, Engvall E, Hoffman EP, Angelini (2002)** Integrin  $\alpha 7 \beta 2$  in muscular dystrophy/myopathy of unknown etiology. *Am. J. Pathol*. 160, 2135-2143.

**Peterson RT, Shaw SY, Peterson TA, Milan DJ, Zhong TP, Scheiber SL, McRae CA, Fishman MC (2004)** Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat. Biotechnol*. 22, 595-599.

**Pikkarainen T, Eddy R, Fukushima Y, Byers M, Shows T, Pihlajemieni T, Saraste M, Tryggvason K (1987)** Human laminin B1 chain. A multidomain protein with gene (LAMB1) locus in the q22 region of chromosome 7. *J. Biol. Chem*. 262, 10454-10462.

**Plenz GAM, Deng MC, Robenek H, Völker W (2003)** Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Artherogenesis*. 166, 1-11.

**Plumb DA, Dhir V, Mironov A, Ferrara L, poulson R, Kadler KE, Thornton DJ, Briggs MD, Boot-Handford RP (2007)** Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillar

structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens. *J Biol Chem.* 282, 12791-12795.

**Postel R, Vakeel P, Topczewski J, Knöll R, Bakkers J (2008)** zebrafish intergrin linked kinase is required in skeletal muscles strengthening the integrin-ECM adhesion complex. *Dev. Biol.* 318, 92-101.

**Pourquié O (2003)** The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science.* 301, 328-330.

**Prévost P (2003)** Le tendon à la loupe. *Sport, santé et préparation physique.* 5, 1-4.

**Pryce BA, Watson SS, Murchinson ND, Staverosky JA, Dünker N, Schweitzer R (2009)** Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGF $\beta$  signaling are essential for tendon formation. *Development.* 136, 1351-1361.

**Quijano-Roy S, Galan L, Ferreira A, Cheliout-Héaut F, Gray F, Fardeau M, Barois A, Guicheney P, Romero NB, Estournet B (2002)** Severe progressive form of congenital muscular dystrophy with calf pseudohypertrophy, macroglossia and respiratory insufficiency. *Neuromuscular Disorders.* 12, 466-475.

**Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bönnemann CG, Jeannet PY, Colomer NF, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Merleir L, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreira A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G, Estournet B (2008)** De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 64, 177-186.

**Reifers F, Böhli H, Walsh EC, Crossley PH, Stainier DYR, Brand M (1998)** Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hinbrain boundary development and somitogenesis. *Development.* 125, 2381-2395.

**Ricard-Blum S (2011)** The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* In press.

**Ricard-Blum S, Dublet B, Van der Rest M (2000)** Unconventional collagens: types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI, and XIX. Livre.

**Ricard-Blum S, Ruggiero F, Van der Rest M (2005)** The collagen superfamily. *Top Curr Chem* 247, 35-84.

**Ricard-Blum S, Ruggiero F (2005)** The collagen superfamily: from the matrix to the cell membrane *pathol biol.* 430-442.

**Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL (1994)** Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* 53, 359-366.

**Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Faber SA, Ekker SC (2007)** p53 activation by knockdown technologies. *PLOS genet.* 3, e78.

**Rodriguez-Guzman M, Montero JA, Sanesteban E, Ganan Y, Macias D, Hurle JM (2007)** Tendon-muscle crosstalk controls muscles bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic acid signaling. *Dev Biol.* 302, 267-280.

**Roulet M, Vallkila M, Chanut-Delalande H, Hamalainen E, Kessler E, Ala-kokko L, Mannikko M, Bonod-Bidaud C, Ruggiero (2010)** The collagen V homotrimer [ $\alpha 1(V)_3$ ] production is unexpectedly favored over the heterotrimer [ $\alpha 1(5)_2 \alpha 2(5)_2$ ] in recombinant expression system. *J Biomed Biotechnol.* 376927-376937.

**Rudnicki MA, Schnegelsberg PNJ, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R (1993)** MyoD or Myf5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 75, 1351-1359.

**Sanger JW, Wang J, Holloway B, Du A, Sanger JM (2009)** Myofrillliogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66, 556-566.

**Schramm C, Solursh M (1990)** The formation of premuscle masses during chick wing bud development. *Anat Embryol (berl).* 182, 235-247.

**Schweitzer J, Beker T, Lefebvre J, Granato M, Schachner M, Beker G (2005)** Tenascin-C is involved in motor axon outgrowth in the trunk of developing zebrafish. *Dev Dyn.* 234: 550-566.

**Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ (2001)** Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development.* 128, 3855-3866.

**Shear CR, Bloch RJ (1985)** Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J Cell Biol.* 101, 240-256.

**Shelton D, Engvall E (2005)** Canine and feline models of human inherited muscle diseases. *Neuromuscul. Disord.* 15, 127-138.

**Shintani S, Sato A, Toyosawa S, O'hUigin C, Klein J (2000)** Biglycan-like extracellular matrix genes of agnathans and teleosts. *J. Mol. Evol.* 51, 363-373.

**Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y (2006)** Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev. Biol.* 289, 234-247.

**Sieger D, Tautz D, Gajewski M (2003)** The role of *Suppressor of Hairless* in Notch mediated signaling during zebrafish somitogenesis. *Mech. Dev.* 120, 1083-1094.

**Silver HF, Freeman JW, Seehra GP (2003)** Collagen self assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biochem.* 36, 1529-1553.

**Smith TG, Sweetman D, Patterson M, Keyse SM, Münsterberg A (2005)** Feedback interaction between MPK3 and ERK MAP kinase control scleraxis expression and the specification of rib progenitors in the developing chick somite. *Development.* 132, 1305-1314.



- Söderhäll C, Marenholz I, Kerscher T, Rüschendorf F, Esparza-Gordillo J, Worm M, Gruber C, Mayr G, Albrecht M, Rohde K, Schulz H, Wahn U, Hubner N, Lee YA (2007)** Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *Plos Biol.* 5, 242-247.
- Song WK, Wang W, Sato H, Bielser DA, Kaufman SJ (1993)** Expression of alpha 7 integrin cytoplasmic domain during skeletal muscle development: alternate forms, conformational change, and homologies with serin/threonine kinase and tyrosine phosphatases. *J. Cell Sci.* 106, 1139-1152.
- Steffen L, Guyon JR, Vogel ED, Beltre R, Pusack TJ, Zhou Y, Zon LI, Kunkel LM (2007)** Zebrafish orthologs of human muscular dystrophy genes. *BMC genomics.* 8, 79-80.
- Stern HM, Murphey RD, Shepard JL, Amatruda JF, Straub CT, Pfaff KL, Weber G, Tallarico JA, King RW, Zon LI (2005)** Small molecules that delay S phase suppress a zebrafish bmyb mutant. *Nat. Chem. Biol.* 1, 366-370.
- Stickney HL, Barresi MJ, Devoto SH (2000)** Somite development in zebrafish. *Dev Dyn.* 219, 287-303.
- Stockdale FE, Miller JB (1987)** The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. *Dev Biol.* 123, 1-9.
- Summers AP, Koob TJ (2002)** The evolution of tendon – morphology and material properties. *CBP.* 133, 1159-1170.
- Summerton J, Weller D (1997)** Morpholino antisens oligomers: design, preparation and proprieties. *Antisens Nucl. Acid. Drug. Dev.* 7, 187-195.
- Swasdison S, Mayne R (1991)** *In vitro* attachment of skeletal muscle fibers to a collagen gel duplicates the structure of myotendinous junction. *Experimental Cell Research.* 193, 227-231.
- Swasdison S, Mayne R (1992)** Formation of highly organized skeletal muscle fibers *in vitro*. Comparison with muscle development *in vivo*. *J Cell Sci.* 102, 643-652.
- Symoens S, Renard M, Bonod-Bidaud C, Syx D, Vaganay E, Malfait F, Ricard-Blum S, Kessler E, van Lear L, Coucke P, Ruggiero F, De Paepe A (2010)** Identification of binding partners interacting with the  $\alpha 1$ -N-propeptide of type V collagen. *Biochem. J.* 22, 371-381.
- Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, Buckingham M, Cossu G (1998)** Differential activation of *Myf5* and *MyoD* by different *Wnts* in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of *Myf5*. *Development.* 125, 4155-4162.
- Takada Y, Ye X, Simon S (2007)** The integrins. *Genome Biology.* 8, 215-216.
- Taussig G (2002)** L'arthrogrypose. *Déficiences motrices et handicaps.* 335-339.
- Telfer WR, Busta AS, Bonnemann CG, Feldman EL, Dowling JJ (2010)** zebrafish models of collagen VI – related myopathies. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2433-2444.

- Thierry L, Geiser AS, Hansen A (2005).** "Collagen types XII and XIV are present in basement membrane zones during human embryonic development." *J. Mol. Histol.* 35, 803-810.
- Tidball JG, Daniel TL (1986)** Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell tissue res.* 245, 315-322.
- Tidball JG, O'Halloran, Burridge K (1986)** Talin at myotendinous junctions. *J cell Biol.* 103, 1466-1472.
- Tidball JG, Lin C (1989)** Structural changes at the myogenic cell surface during the formation of myotendinous junctions. *Cell Tissue Res.* 257, 77-84.
- Tidball JG (1991)** Force transmission across muscle cell membrane. *J Biol Chem.* 24, 43-52.
- Tidball JG (1994)** Assembly of myotendinous junction in the chick embryo: deposition of P68 is an early event in myotendinous junction formation. *Dev. Biol.* 163, 447-456.
- Tidball JG, Law DJ (1991)** Dystrophin is required for normal thin filament – membrane associations at myotendinous junctions. *Am J pathol.* 138, 17-21.
- Thornhill P, Basset D, Lochmüller H, Bushby K, Straub V (2008)** Developmental defects in a zebrafish model for muscular dystrophies associated with the loss of fukutin-related protein (FKRP). *Brain.* 131, 1551-1561.
- Tongiorgi E (1999)** Tenascin-C expression in the trunk of wild-type, *cyclops* and *floating head* zebrafish embryos. *Brain Research.Bulletin.* 48, 79-88.
- Tozer S, Duprez D (2005)** Tendon and ligament: development, repair and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75, 226-236.
- Trotter JA, Eberhard S, Samora S (1986)** Structural connections of the muscle-tendon junction. *Cytoskeleton.* 3, 431-438.
- Tuckwell D (2002)** Identification and analysis of collagen  $\alpha 1(\text{XXI})$ , a novel member of FACIT collagen family. *Matrix biol.* 21, 63-66.
- Vailas AC, Pedrini DA, Pedrini-Mille A, Holloszy JO (1985)** Patellar tendon matrix changes associated with aging and voluntary exercise. *J appl Physiol.* 58, 1572-1576.
- Van Eeden FJM, Granato M, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jian YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Warga RM, Allende ML, Weinberg ES, Nüsslein-Volhard (1996)** Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development.* 123, 153-164.
- Veit G, Hansen U, Keene DR, Bruckner P, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M, Koch M (2006)** Collagen XII Interacts with Avian Tenascin-X through Its NC3 Domain. *J. Biol. Chem.* 481, 27461-27470.

- Viet G, Kobbe B, Keene DR, Paulson M, Koch M, Wagener R (2006)** Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfection in collagenous domain. *J Biol Chem* 281, 3494-3504.
- Vogel KG (2003)** Tendon structure and response to changing mechanical load. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 3, 323-325.
- Von Hofsten J, Elworthy S, Gilchrist MJ, Smith JC, Wardle FC, Ingham PW (2008)** Prmd1- and sox6- mediated transcriptional repression specifies muscle fibre type in the zebrafish embryo. *EMBO Rep.* 9, 683-689.
- Wake K (1976)** Formation of myoneural and myotendinous junctions in chick embryo. Role of acetylcholinesterase-rich granules in the developing muscle fibers. *Cell Tissue Res.* 173, 383-400.
- Wang Y, Chen K, Yao Q, Zheng X, Yang G (2009)** Phylogenetic analysis of zebrafish basic helix loop helix transcription factors. *J. Mol. Evol.* 68, 629-640.
- Weinberg ES, Allende ML, Kelly CS, Abdelhamid T, Murakimi P, Andermann OG, Doerre DJ, Grundwald B, Riggleman B (1996)** developmental regulation of MyoD in wild type no tail and spadetail embryos. *Development.* 122, 271-280.
- Wewer UM, Engvall E (1996)** Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. *Neuromusc Disord.* 6, 409-418.
- Whittaker, CA, Hynes RO (2002)** Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell.* 13, 3369-3387.
- Wolff C, Roy s, Ingham PW (2003)** Multiple muscle cell identities induced by distinct levels and timing of hedgehog activity in zebrafish embryo. *Curr Biol.* 13, 1169-1181.
- Woods IG, Kelly PD, Chu Felicia, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Huang H, Postelwait JH, Talbot WS (2000)** A comparative map of the zebrafish genome. *Genome. Research.* 10, 1903-1914.
- Wu C (1999)** Integrin linked-kinase and PINCH: partner in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci.* 24, 4485-4489.
- Wu M, Falasca M, Blough ER (2010)** Akt/protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *J Cell Physiol.* 226, 29-36.
- Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E (1994)** Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin  $\alpha 2$  (*LAMA2*) gene. *Nat. Genet.* 11, 216-218.
- Xu PX, Cheng J, Epstein JA, Maas RL (1997)** Mouse *Eya* genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 11974-11979.

**Xu R, Yao ZY, Xin L, Zhang Q, Li TP, Gan RB (2001)** NC1 domain of human type VIII collagen (alpha 1) inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 264-268.

**Yamada H, Denzer AJ, Hori H, Tanaka T, Anderson LVB, Fudjita S, Fukuta-Ohi H, Shimizu T, Ruegg MA, Matsumura K (1996)** Dystroglycan is a dual receptor for agrin and laminin-2 in Schwann cell membrane. *J Biol Chem.* 271, 23418-23423.

**Young BB, Gordon MK, Birk DE (2000)** expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev Dyn.* 217, 430-439.

**Yurchenco PD, Quan Y, Colognato H, Mathus T, Harrison D, Yamada Y, O'Rear JJ (1997)** The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partner. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 94, 10189-10194.

**Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, Birk DE (2005)** Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. *J musculokelet Neuronal Interact.* 5, 5-21.

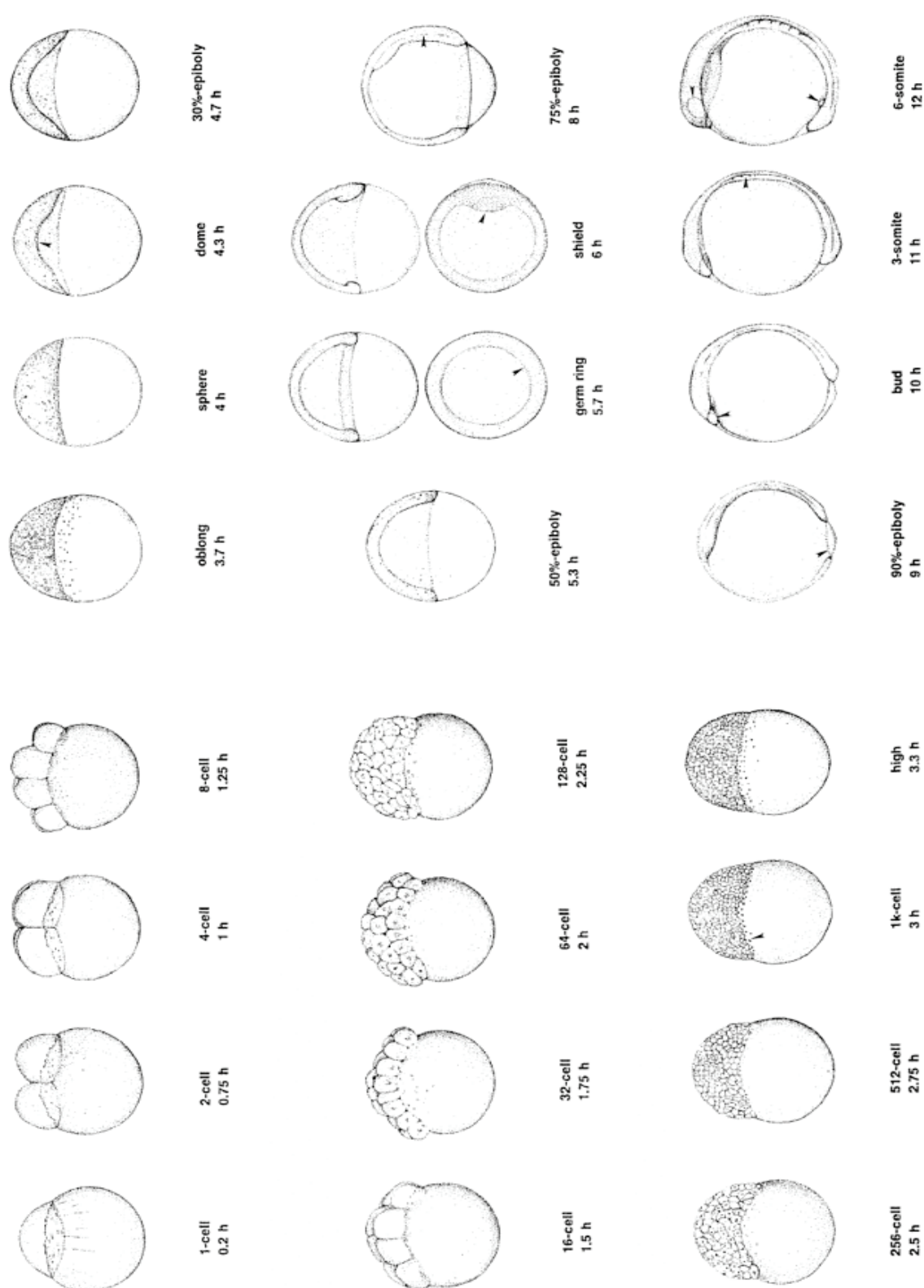
**Zhang X, Vuolteenaho R, Tryggvason K (1996)** Structure of the human laminin  $\alpha 2$ -chain gene (*LAMA2*), which is affected in congenital muscular dystrophy. *JBC.* 271, 27664-27669.

**Zhang M, Wang W (2003)** Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Account of chemical research.* 36, 530-538.

**Zoeller JJ, McQuillan A, Whitelock J, Ho SY, Iozzo RV (2008)** A central function for perlecan in skeletal muscle and cardiovascular development. *JBC.* 181, 381-394.

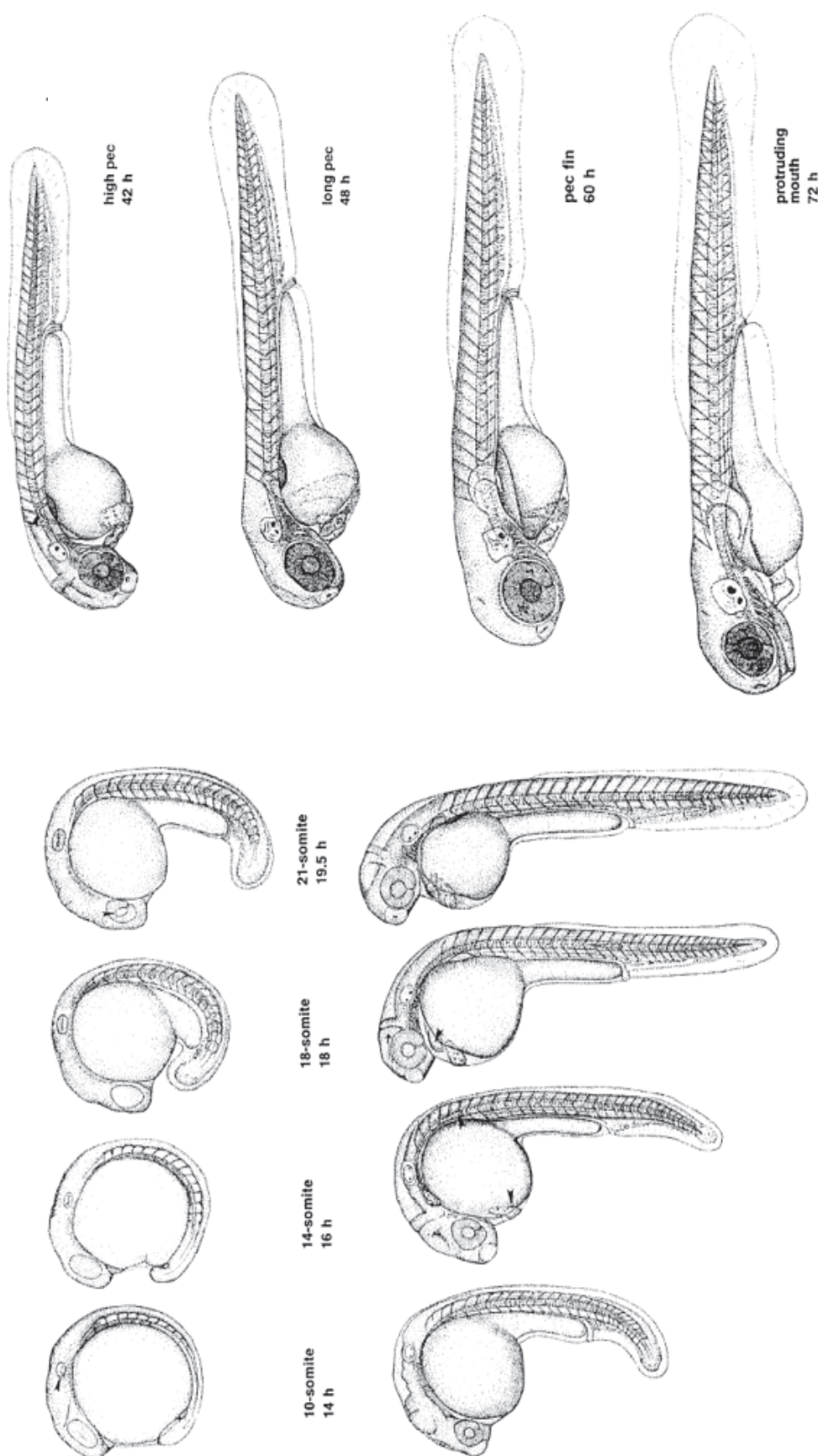
**Zoeller JJ, Whitelock JM, Iozzo RV (2009)** Perlecan regulate developmental angiogenesis by modulating the VEGF-VEGFR2 axis. *Matrix Biol.* 28, 284-291.

## Annexes :



**Annexe I : Représentation schématique des différents stades de développement.**  
D'après kimmel *et al.*, 1995.





Gene	Symbol	Associated Disease	Fish EST	Notes	Fish Genomic Location			Fish BAC Loc			Synteny	Notes
					Scaffold location	Clone Location	Gene location	Notes	BAC Name	Notes		
Calpain-3	<b>CAPN3</b>	LGMD2A	NM_001004571		2601	NA-BX322589	Chr17 62.6 Mb and 63.1 Mb	By blasts and synteny, appears split. The first ~ 1550 nt has no corresponding BAC.	N/A – zC283F6	Human CAPN3 matches well with zK12H9	Yes	Syntenic with GANC on genome and ZFP106 on genome and BAC (zC283F6)
Caveolin 3	<b>CAV3</b>	LGMD1C, hyperCKemia, Rippling muscle disease	NM_205738		879	BX664752	Chr6 33.2 Mb	Organized in 2 exons, similar to human CAV3	zKp111E5		On one side	Syntenic with OXTR on BAC and genome.
Dystrophin	<b>DMD</b>	Duchenne MD, Becker MD	XM_678461, XM_678362, XM_678552, partial	All three are partial transcripts, but in order, cover most of the DMD coding region	42	BX004756, CT033808	Chr1 9.6 Mb-9.4 Mb	Duplications within gene likely incorrect. Additional partial sequence located on Chr1 scaffold 49 at 10.5 Mb	zC59A4, zC274B7	Transcripts span these two overlapping BACs	No	
Dysferlin	<b>DYSF</b>	LGMD2B, Myoshi Myopathy, Distal myopathy with anterior tibial onset	XM_684324	Many transcripts are similar to dysferlin, but this is the only one that aligns closer to dysferlin (rather than myoferlin or otoferlin) on reciprocal blast	1155	CR847843	Chr7 83.3 Mb-83.5 Mb	Human dysferlin also identifies Chr12 (BC063743, likely fish myoferlin) and Chr13 (XM_682373, similar to myoferlin, dysferlin, and otoferlin)	zKp78E10 – bZ50C18	The first BAC contains the 5' – 1/7th while the second BAC overlaps and gives coverage to the transcript end	No	Flanking genes are on Chr7 but not in the same region or on the same scaffold as dysferlin
Emerin	<b>EMD</b>	Emery-Dreifuss MD	XM_685843, XM_549369	Identical except for a single 7nt internal fragment. Likely alternatively spliced variants. Poor homology to mammalian emerin.	3352	No data	Chr23 18.96 Mb	Duplication of last 4/5 of transcript on Chr7 39.54 Mb, scaffold 1085. No synteny with Chr7.	zC133L21	Identical matches on unfinished BACs zK233H12, zK181F15, and zK93L1.	Yes	RPL10 and FLNA are at 19.1 Mb and 19.0 Mb, on Chr23 Both are syntenic on BACs.
Fukutin related protein	<b>FKRP</b>	MDC1C, LGMD21	XM_695011, partial		2206	No data	Chr15 26.6 Mb		zK31C13		Yes	STRN4 and SLC1A5 are syntenic on the genome and the BAC.
Lamin A/C	<b>LMNA</b>	Emery-Dreifuss MD, LGMD1B, CMD1A, etc.	NM_152971		2371	CR848742	Chr16 37.8 Mb		zK181C1		No	Flanking genes are not syntenic with each other, either
Myotilin	<b>TTID</b>	LGMD1A, myofibrillar myopathy	None found	Closest match is Zv5 predicted transcript ENSDARG015348	1999	C1573287	Chr14 12.2 Mb & 10.8 Mb	ENSDARG015348 split between two loci in Zv5. Genome incorrect.	zK101K8	Complete and contiguous BAC coverage	No	Flanking genes are not syntenic with each other, either
Sarcoglycan alpha	<b>SGCA</b>	LGMD2D	XM_680178	Close homology with SCGE	1664	BX548040	Chr12 870 Kb		zC190L11		On one side	Syntenic with Col1A1 on both genome and BAC
Sarcoglycan beta	<b>SGCB</b>	LGMD2E	NM_001034973	First half of transcript aligns with full length of human SGCB	2974	CT583700	Chr20 59.8 Mb	Second half of EST is located on Chr25 1.3 Mb (Scaffold 3566)	zC253J24		Yes	Both genes syntenic on genome and BAC
Sarcoglycan delta	<b>SGCD</b>	LGMD2F, CMD1L	NM_001001816		3106	BX294656	Chr21 39.0-38.7 Mb		zC238M13	First 300nt located on zK189O20	On one side	Syntenic with MRPL22
Sarcoglycan gamma	<b>SGCG</b>	LGMD2C	NM_001003748		2184	BX927291	Chr15 20.2 Mb	Incomplete coverage. Duplicate exon also on scaffold 2184 but not on BAC.	zC261A10	Complete coverage	On one side	Syntenic with SACS on both genome and BAC
Telethonin	<b>TCAP</b>	LGMD2G, Dilated cardio-myopathy (CMD1N)	XM_679011		371	CR387996	Chr3 19.9 Mb	Human TCAP also identifies a locus on Chr16 scaffold 2377 but coverage is less complete and exons are not contiguous	zK183N6		No	
Tripartite Motif-containing protein 32	<b>TRIM32</b>	LGMD2H	XM_686142	Human TRIM32 only has one coding exon.	NA688	No data	No data	Coding sequence on scaffold NA688. Putative 5' UTR exons are located in duplicate on Chr8, scaffold 1244	None	Putative 5' UTR exons are located on zK72L14 & zK65O14	Yes	ASTN2 spans the both the human and the zebrafish TRIM32 loci on Scaffold NA688
Titin	<b>TTN</b>	LGMD2J, Tibial MD, Hereditary Myopathy with early respiratory failure	XM_679005 (TTN2, partial), XM_678144 (TTN1, partial)	Locus is duplicated. Only partial transcripts available	3186	BX640499, BX571737, BX640465	Chr9 41.8 Mb-42.2 Mb	Locus duplications are in tandem. Duplicate genes are divergent in sequence and likely to be true duplicates.	zKp67D2, dZ358D18, zK190I10, dZ249N21, zC198B21	BACs overlap to cover the entire titin locus.	Yes	Syntenic with FLJ39502 and FKBP7 on genome and BAC.

Annexe II : liste des gènes orthologues de poisson zèbre, impliqués dans les dystrophies musculaires humaines.



Gene	Symbol	Associated Disease	Fish EST	Notes	Fish Genomic Location			Notes	Fish BAC Loc		Synteny	Notes
					Scaffold location	Clone Location	Gene location		BAC Name	Notes		
Collagen 6A1	<b>Col6A1</b>	Bethlem myopathy, Ullrich CMD	XM_693161, partial		1607	CR925698	Chr11 35.3 Mb		zK287112		On one side	Syntenic with Col6A2 on genome and BAC.
Collagen 6A2	<b>Col6A2</b>	Bethlem myopathy, Ullrich CMD	XM_691072	The first 320 bases are likely not part of this transcript.	1607	CR925698 - BX323597	Chr11 35.2 Mb	The first 320 bases are located in multiple places on other chromosomes	zK287112 - zC227N13	The first 320 bases are located on zC184B9.	On one side	Syntenic with Col6A1 on genome and BAC.
Collagen 6A3	<b>Col6A3</b>	Bethlem myopathy, Ullrich CMD	XM_679796	XM_687365 is also orthologous to mammalian Col6A3, but is more similar to a second predicted Col6A3 mammalian locus.	1361-1360	No data	Chr9 19.0 Mb and 15.0 Mb	The beginning is located on scaffold 1361, the repeating middle elements are on both scaffolds, and the end is on 1360. Note that the genomic locus may be misorganized.	zC5M6	Unfinished BAC covers entire transcript on various fragments	Yes	Syntenic with MLPH on Chr9 and with COP58 on Chr9 and clone zC5M6.
Desmin	<b>DES</b>	DCM1, CMD11, several skeletal and/or cardio-myopathies	NM_130963		1342	No data	Chr9 7.3 Mb	Several loci are orthologous to human desmin. Most ruled out due to closer homology with other proteins. Additional loci on Chr20 (scaffold 2945), and Chr13 (scaffold 1885) could not be ruled out and may be duplications.	None	Homologous sequences were found, but none were near-exact matches to the zebrafish transcript sequence.	No	Chr9 locus is not syntenic with the other desmin-like genes, either.
Fukutin	<b>FCMD</b>	Fukuyama CMD	XM_686729, partial		792, 793	CR753888 CT027618 BX072578	Chr5 78.4-79.0 Mb	Full match on the first two clones, partial match on the third. Likely a genomic misalignment.	zC286A10, zC154E10	Full coverage of the partial transcript on both	On one side	FSD1CL is syntenic on both genome and BAC.
Filamin C	<b>FLNC</b>	Myofibrillar myopathy	XM_693754, XM_687344, partial	Duplicated. Divergent nucleotide sequences. First contains the Human FLNC unique region. Second transcript is only partial.	505, 3643	AL954190, No data	Chr4 7.5 Mb, Chr25 32.9 Mb	Human FLNC unique region is not part of XM_687344, but is located immediately after it on Chr25.	zC284B12, zK3006	Both BACs match XM_693754. No BACs for XM_687344	On one side	Chr4 locus not syntenic, though flanking genes are elsewhere on Chr4. Partial NAG6 matches on Chr25.
Integrin Alpha 7	<b>ITGA7</b>	CMD with integrin deficiency	None found	Closest EST is a closer match to mammalian ITGA6	1560	No data	Chr11 2.5 Mb	Location identified using human ITGA7 only	zC245G15	Used human ITGA7	No	Flanking genes are not syntenic with each other, either
Acetylglucosaminyl-transferase-like protein	<b>LARGE</b>	MDC1D	NM_001004537	LARGE1B (NM_001004538) is highly orthologous.	570	No data	Chr4 39.4 Mb	LARGE1B located on Chr18, scaffold 2725, clone BX908385.	None	LARGE1B located on both zC282N12 & zC206G24	No	The closest flanking genes are predictions
Laminin alpha 2	<b>LAMA2</b>	Merosin-deficient CMD	XM_694983	Partial, predicted	2875	No data	Chr20 3.8 Mb	Aligns with LAMA2 predicted transcripts GenScan01065 and FGENESH78171	None		On one side	Syntenic with ARHGAP18, but NOT the highly similar LAMA1 locus (on Chr24)
Polyadenylate-binding protein, nuclear 1	<b>PABPN1</b>	Oculo-pharyngeal MD	BC079522	NM_213259 also matches but diverges over the 3' non-coding end. NM_213259 3' end is discontinuous with its 5' end on the genome and BACs and may not represent a real transcript.	3471	BX294113 and CTS83644	Chr24 21.4 Mb and 21.6 Mb	Duplication on Chr24 clones is likely due to genomic misalignment since clones overlap in the Sanger fingerprinted contigs.	zKp73G8		No	SLC22A17 is located on Chr24, but not in the same region.
Protein O-Mannose Beta-1,2-N-Acetylglucosaminyl-transferase	<b>POMGNT1</b>	Muscle-eye-brain (MEB)	BC097123		985	No data	Chr6 69.0 Mb		zK170G13, zC156B18	Sequencing of first BAC is unfinished	On one side	Syntenic with TSPAN1 on both genome and BAC
Protein O-mannosyl-transferase 1	<b>POMT1</b>	LGMD2K, Walker Warburg syndrome	XM_693177		723	BX511209 and No data	Chr5 56.2 Mb & 56.3 Mb	Split between 3 loci. Exons 1-3 at first location, exons 3-17 at second location. Exons 17-22 potentially on Chr17 at 37.47 Mb.	zC129A6	Covers only first 3 exons. No matches for other exons.	No	
Sarcoglycan epsilon	<b>SGCE</b>	Myoclonic dystonia	NM_001002594	Close homology with SCGA	2827	BX640469	Chr19 41.07 Mb		zK104M9		On one side	Syntenic with CASD1 on both genome and BAC
Selenoprotein N, 1	<b>SEPNI1</b>	Rigid spine MD1 (RSM1), Multiminicore disease	NM_001004294		2451	BX323794 & R626962	Chr17 1.8 Mb & 2.3 Mb	Duplication likely due to genome misalignment since the BACs overlap. Both clones have full transcript coverage.	zC247C16, zC15D5	BACs overlap, suggesting that the genomic duplication is a misalignment.	On one side	Syntenic with FAM154B on genome and BAC

CMD/DCM-Congenital Muscular Dystrophy, MD-Muscular Dystrophy, nt-nucleotides.

nom du mutant	gène muté	protéine affectée
<i>acerebellar (Ace)</i>	<i>fgf8</i>	FGF8
<i>after eight/Delta D (Aei)</i>	<i>deltaD</i>	DeltaD (ligand du recepteur Notch)
<i>b567</i>	<i>her1 et her7</i>	facteur de transcriptions HER1 et HER7
<i>beamter/deltaC</i>	<i>deltaC</i>	DeltaC (ligand du recepteur Notch)
<i>candyfloss (Caf)</i>	<i>lama2</i>	chaîne $\alpha 2$ des laminines
<i>crash and burn (Crb)</i>	<i>bmyb</i>	regulateur transcriptionnel proto-oncogène
<i>Deadly seven/Notch a1 (Des)</i>	<i>notcha1</i>	Notch
<i>Patchytail (Dag1)</i>	<i>dag1</i>	dystroglycan
<i>fibrils unbundled (Fub1)</i>	<i>inconnu</i>	inconnue
<i>gridlock (Grl)</i>	<i>hey2</i>	facteur de transcriptions HEY2
<i>loc/ilk</i>	<i>Ilk</i>	Integrin Linked Kinase
<i>retalively relaxed (Ryr)</i>	<i>ryr1b</i>	Ryanodine
<i>Sapje (Sap)</i>	<i>dmd</i>	dystrophine

**Annexe III : Récapitulatif des lignées de poissons zèbres mutants mentionnées dans le manuscrit.**

RESUME en français : La jonction myotendineuse (JMT) est une interface spécialisée dans la transmission des forces entre le muscle et le tendon. Le collagène XXII (COLXXII) est un nouveau composant de cette jonction (Koch *et al.*, 2004). COLXXII fait partie de la sous-famille des FACITs (Fibrils Associated Collagen with Interrupted Triple helix) qui se caractérisent par leur capacité à s'associer aux collagènes fibrillaires pour former des réseaux protéiques. La fonction de ce nouveau composant de la JMT n'est pas connue. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser une perte de fonction chez le poisson zèbre en utilisant la stratégie anti-sens morpholinos et d'en étudier le phénotype par différentes techniques. Chez l'embryon, le COLXXII est exprimé aux extrémités des fibres musculaires au niveau de leur ancrage sur le myosepte (structure équivalente au tendon des mammifères) pour être déposé à la JMT. Son expression est régulée par des membres de la famille des FGF, probablement FGF8. L'absence de COLXXII conduit à une perte des capacités contractiles du muscle et au détachement et à la rétraction progressive des fibres musculaires, causés par une rupture de la JMT qui s'opère entre la lame basale des fibres musculaires et la matrice tendineuse. Le morphotype induit par l'injection de morpholino COLXXII phénocopie les mutants *sapje* (mutant dystrophine) et *candyfloss* (mutation de la chaîne  $\alpha 2$  des laminines) indiquant que COLXXII permet un lien structural entre le muscle et le tendon. Nos résultats montrent que COLXXII joue un rôle crucial dans le développement et la fonction de la JMT et représente un nouveau gène candidat pour les dystrophies musculaires.

---

TITRE en anglais

The myotendinous junction? Collagen XXII as a new candidate gene for muscular dystrophies. A study in developing zebrafish.

---

RESUME en anglais : The myotendinous junction (MTJ) is a specialized structure that transmits muscle contractile forces to tendon. Collagen XXII (COLXXII) is a novel component of MTJ (Koch *et al.*, 2004). It belongs to the FACITs (Fibrils Associated Collagen with Interrupted Triple helix) subset of the collagen superfamily that is characterized by their capacity to mediate protein-protein interactions. The *in vivo* role of COLXXII has not been elucidated. Therefore, we decided to analyze its function in developing zebrafish using the morpholino-based knock-down strategy. We showed that its transcripts are exclusively expressed at the extremities of muscle fibers close to myoseptal tendons and the protein is deposited at the MTJ. The onset of COLXXII expression depends on FGF signaling, probably FGF8. Using different methods, we showed that loss of COLXXII induces morphofunctional alterations of muscle/tendon development and muscle weakness. Progressive muscle fiber detachment and retraction are observed in morphants that result from MTJ failure occurring at the muscle basement membrane/myosepta extracellular matrix side. The morphotype of the MO22-injected embryos is reminiscent to the *sapje* (dystrophin mutant) and *candyfloss* (laminin  $\alpha 2$  chain mutation) mutant phenotypes indicating that COLXXII provides a molecular link between muscle and tendons. Our results suggest that COLXXII plays a crucial role in MTJ development and function and represents a novel candidate gene for muscular dystrophies.

---

DISCIPLINE Biologie

---

MOTS-CLES Poisson zèbre, collagène, matrice extracellulaire, jonction myotendineuse, muscle, myosepte. Développement, Dystrophie musculaire.

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : Matrix Biology and Pathology ; Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon ; UMR-CNRS 5242 - ENS de Lyon 47, allée d'Italie ; 69364 Lyon Cedex 08